



## Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

**Aktenzeichen:** 103 17 008.1

**Anmeldetag:** 11. April 2003

**Anmelder/Inhaber:** Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH,  
Ingelheim/DE

**Bezeichnung:** gM-negative EHV-Mutanten ohne heterologe Elemente

**IPC:** C 12 N 7/01

**Bemerkung:** Die nachgereichte vollständige Seite 33 der Beschreibung ist am 13. April 2003 eingegangen.

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 18. Juni 2003  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
**Der Präsident**  
Im Auftrag

A stylized, handwritten signature in black ink. The signature is written in a cursive style, with a large, sweeping 'R' shape. Below the signature, the name 'Dzierzer' is printed in a small, sans-serif font.

## **gM-negative EHV-Mutanten ohne heterologe Elemente**

### **Gebiet der Erfindung**

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Tiergesundheit und insbesondere Pferde-Herpesviren (EHV), worin das Gen, das das Protein gM kodiert, abwesend ist und die frei von heterologen Elementen sind. Weitere Aspekte der Erfindung betreffen pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Viren umfassen, deren Verwendung und Verfahren für die Prophylaxe und Behandlung von EHV-Infektionen. Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Kombination der Viren EHV-1 und EHV-4 enthalten, worin das Gen, das das Protein gM kodiert, abwesend ist und die frei von heterologen Elementen sind.

### **Hintergrund der Erfindung**

Pferde-Herpesvirus 1 (EHV-1), ein Mitglied der Alphaherpesvirinae, ist die Hauptursache für den Virus-induzierten Abort bei Pferden und ruft Atemwegsstörungen und neurologische Störungen hervor. Pferde-Herpesvirus 4 (EHV-4) kann ebenfalls Atemwegssymptome, Aborte oder neurologische Störungen induzieren. Die gesamte DNA-Sequenz beider Spezies (EHV-1: Stamm Ab4p; EHV-4: Stamm NS80567) ist bestimmt worden (Telford, E.A.R. et al., 1992; Telford, E.A.R. et al., 1998). Nur wenige Gene und Genprodukte sind jedoch im Hinblick auf ihre Relevanz für die Virulenz und die immunogenen Eigenschaften von EHV charakterisiert worden.

Herpesvirus-Glykoproteine sind in kritischer Weise an frühen Stadien der Infektion, an der Freisetzung von Virionen aus Zellen und an der direkten Zell-zu-Zell-Ausbreitung von Virionen durch Fusion benachbarter Zellen beteiligt. Bis heute sind 11 von Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) kodierte Glykoproteine identifiziert und als gB, gC, gD, gE, gG, gH, gI, gJ, gK, gL und gM bezeichnet worden. HSV-1-Mutanten, denen gC, gE, gG, gI, gJ und gM fehlt, sind lebensfähig, was darauf hindeutet, dass diese Gene für die Replikation in kultivierten Zellen verzichtbar sind. Ein Vergleich

der Nucleotidsequenzen von HSV-1 und Pferde-Herpesvirus 1 zeigte, dass alle bekannten HSV-1-Glykoproteine in EHV-1 konserviert sind. Nach der gegenwärtigen Nomenklatur werden diese Glykoproteine durch die Namen ihrer HSV-1-Homologen bezeichnet. Es ist bekannt, dass EHV-1 gC, gE und gI für das Wachstum in Zellkulturen nicht essentiell sind, während gB und gD für das Viruswachstum in kultivierten Zellen essentiell sind. Die Beiträge anderer EHV-1-Glykoproteine zur Replikation in kultivierten Zellen sind nicht bekannt (Flowers, C.C. et al., 1992). Transkriptionale und Proteinanalysen haben gezeigt, dass die Glykoproteine gB, gC, gD, gG, gH und gK in EHV-1-infizierten Zellen exprimiert werden. Glykoprotein gM (kodiert durch das Gen UL10 [Baines, J.D. et al., 1991; Baines, J.D. et al., 1993]) ist das einzige nicht essentielle Glykoprotein, über das berichtet wurde, das in allen Herpes-viralen Subfamilien konserviert ist, und es ist für Mensch- und Maus-Cytomegalovirus und die Gammaherpesvirinae-Mitglieder EHV-2, Herpesvirus saimiri und Epstein-Barr-Virus beschrieben worden. Wie viele Herpesvirus-Glykoproteine ist HSV-1 gM in Virionen und Membranen von infizierten Zellen vorhanden. HSV-1-Mutanten, denen nur gM fehlt, wuchsen bis auf Titer in Zellkultursystemen, die ungefähr 10-fach relativ zu denen von Wildtypviren verringert waren, und zeigten eine verringerte Virulenz in einem Mausmodell (Baines, J.D. et al., 1991; MacLean, C.A. et al., 1993). Das EHV-1 gM-Homologe (gp21/22a; von nun an bezeichnet als EHV-1 gM) wurde zuerst von Allen und Yeargan (Allen, G.P. et al., 1987) beschrieben, und es wurde gezeigt, dass es ein Hauptbestandteil der Virushülle ist. Weitere Untersuchungen zeigten, dass Gen 52, das Gen homolog zu HSV-1 UL10, das 450 Aminosäuren umfassende EHV-1 gM-Polypeptid kodiert (Pilling, A. et al., 1994; Telford, E.A.R. et al., 1992). EHV-1 gM stellt ein multiples hydrophobes Protein dar, das acht vorhergesagte Transmembrandomänen enthält und über das berichtet wurde, dass es in infizierten Zellen und in gereinigten Virionen als ein Protein von  $M_r$  45.000 vorhanden ist (Pilling, A. et al., 1994; Telford, E.A.R. et al., 1992).

Zur Bekämpfung von EHV-1-Infektionen folgt man zwei verschiedenen Ansätzen. Erstens sind modifizierte Lebendvaccine (MLVs) entwickelt worden, unter Einfluss von Stamm Rach (Mayr, A. et al., 1968; Hübert, P.H. et al., 1996), der weit verbreitet in Europa und in den Vereinigten Staaten verwendet wird. Zweitens inaktivierte

Vaccine und Untereinheiten-Vaccine auf der Basis von rekombinanten exprimierten viralen Glykoproteinen, wie den Glykoproteinen (g) B, C, D und H, die einen teilweisen Schutz gegen eine anschließende EHV-1-Belastungsinfektion in einem Mausmodell induzierten. Untereinheiten-Vaccine, die die Glykoproteine umfassen, z.B. gB, gC, gD und gH, schützen nur schlecht gegen eine erneute Infektion (Awan et al., 1990; Osterrieder et al., 1995; Tewari et al., 1994; Stokes et al., 1996).

Das technische Problem, das der Erfindung zugrunde liegt, bestand darin, verbesserte Vaccine bereitzustellen, die besser gegen eine EHV-Infektion schützen als Vaccine aus dem Stand der Technik.

## Figurenlegenden

Figur 1: Erzeugung eines gM-negativen EHV-1 Rach-Virus ohne fremde Sequenzen (HΔgM-w).

Diese Figur zeigt eine Karte von Viren und Plasmiden, die für die Konstruktion von HΔgM-w verwendet wurden. HΔgM-Virus der ersten Generation wurde zuvor konstruiert durch Insertion von *Escherichia coli lacZ* (HΔgM-lacZ) oder der grünen fluoreszierendes Protein (GFP)-Expressionskassette (HΔgM-GFP). Die BamHI-Karte des EHV-1-Stamms Rach ist gezeigt (A), und das BamHI-HindIII-Fragment, das den gM-ORF enthält, ist vergrößert, wobei die genomische Organisation der Region gezeigt ist (B). Das gM-negative Virus HΔgM-GFP trägt eine GFP-Expressionskassette, die den Hauptteil des EHV-1 gM-Gens ersetzt. Die GFP-spezifische Sonde, die in Southern-Blots verwendet wurde, ist gezeigt (C). Plasmid pBH3.1 trägt das interessierende EHV-1 BamHI-HindIII-Fragment und wurde zur Konstruktion von Plasmid pXuBaxA verwendet. Nach Cotransfektion der DNA von HΔgM-GFP mit Plasmid pXuBaxA resultierte HΔgM-w (D). Restriktionsstellen: BamHI - B, HindIII - H, SphI - S, HincII - Hc, ApaI - A, PstI - P.

Figur 2: Southern-Blot von gM-deletiertem EHV-1-Virus ohne Fremdsequenzen (HΔgM-w).

DNA von R<sub>ach</sub>H, H $\Delta$ gM-GFP und H $\Delta$ gM-w wurde mit BamHI, HindIII oder PstI geschnitten und mit einer GFP-spezifischen Sonde (GFP) oder dem EHV-1 BamHI-HindIII-Fragment von pBH3.1 (pBH3.1) analysiert. DNA-Hybride wurden durch Chemolumineszenz unter Verwendung von CSPD nachgewiesen. Molekulargewichtsmarker (Biolabs) sind in kbp am linken Rand angegeben. Der Pfeil weist auf ein kaum sichtbares spezifisches Hybrid.

Figur 3: Erzeugung eines gM-negativen EHV-4-Virus ohne Fremdsequenzen (E4 $\Delta$ gM-w).

In dieser Figur ist eine BamHI-Karte von EHV-4-Stamm NS80567 gezeigt. Das vergrößerte BamHI-e-Fragment umfasst den gM ORF und benachbarte ORFs (A). Plasmidkonstrukte und Primingstellen sind gezeigt (B). Plasmid pgM4GFP<sup>+</sup> wurde für die Erzeugung von E4 $\Delta$ gM-GFP, dem GFP-positiven und gM-negativen EHV-4, verwendet (B, C). Rekombination von DNA von E4 $\Delta$ gM-GFP mit Plasmid pgM4R (B), enthaltend 3.109 bp von EHV-4-Sequenzen unter Einschluss des gM-ORF, resultierte in E4RgM, dem gM-reparierten EHV-4 (A), oder mit Plasmid pgM4w (B) resultierte in E4 $\Delta$ gM-w, dem GFP- und gM-negativen EHV-4 (D). Restriktionsstellen: BamHI - B, PstI - P, EcoRI - E, Sall - Sa, MluI - M, AsnI - As, EcoRV - EV.

Figur 4: Southern-Blot eines gM-deletierten EHV-4-Virus ohne Fremdsequenzen (E4 $\Delta$ gM-w).

DNA von EHV-4, E4RgM, E4 $\Delta$ gM-w und E4 $\Delta$ gM-GFP wurde mit PstI, EcoRV oder HindIII geschnitten, wie angegeben, und DNA-Fragmente wurden auf Nylon-Membranen übertragen. Parallele Membranen wurden entweder mit GFP-spezifischen Sequenzen oder mit einer Sonde, bezeichnet als gM3.1, die EHV-4-spezifische Sequenzen, die dem Plasmid pgM4R entnommen waren, enthielt, hybridisiert (Fig. 3). DNA-Hybride wurden durch Chemolumineszenz unter Verwendung von CSPD nachgewiesen. Molekulargewichtsmarkergrößen (Biolabs) sind in kbp angegeben.

Figur 5: Wachstumscharakteristiken des gM-deletierten EHV-4-Virus E4 $\Delta$ gM-w.

Zellen wurden bei einem MOI-Wert von 2 mit verschiedenen Viren, wie im Kasten angegeben, infiziert. Kinetiken des Viruswachstums sind als Virustiter, bestimmt in Überständen von infizierten Zellen (extrazelluläre Aktivität) oder innerhalb infizierter Zellen (intrazelluläre Aktivität), relativ zum angegebenen Zeitpunkt, bezeichnet. Gezeigt sind die Mittelwerte von zwei einzelnen Experimenten; Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben.

Figur 6: Plaquegrößen von E4ΔgM-w.

Vero- oder Vero-gM-Zellen in Platten mit sechs Vertiefungen wurden mit 50 PFU an entweder EHV-4, E4RgM, E4ΔgM-GFP oder E4ΔgM-w infiziert. Maximale Durchmesser von 150 entsprechenden Plaques wurden bestimmt, und die mittlere Plaquegröße ist in Prozent, relativ zur Größe der Wildtyp-Plaques, die auf 100% gesetzt wurde, angegeben. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken angegeben (A). Plaques wurden durch indirekte Immunfluoreszenz (anti-gD Mab 20C4, 1:1000) am Tag 4 p.i. angefärbt und in einem Axioscope (x100, Zeiss, Deutschland) analysiert. Bilder wurden erfasst und digital verarbeitet (B).

Figur 7: EHV-4-Viruspenetration in Vero-Zellen

Penetration von EHV-4, E4RgM, E4DgM-w und E4DgM-GFP, erzeugt auf nicht-komplementierenden Vero-Zellen (A) oder komplementierenden Vero-gM-Zellen (B), in Vero-Zellen. Zu angegebenen Zeitpunkten wurde der Penetrationswirkungsgrad als der Prozentsatz der Anzahl der Plaques, die nach Citratbehandlung vorhanden waren, relativ zu dem der Plaques, die nach Kontrollbehandlung vorhanden waren, angegeben. Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten sind angegeben. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken bezeichnet.

Figur 8: PCR-Primer-Sequenzen und Anordnung von Amplifikaten innerhalb des EHV-4-Genoms.

Sequenzen, die Restriktionsenzym-Erkennungsstellen darstellen, sind fett gedruckt, und die entsprechenden Enzyme sind aufgelistet. PCR-Produkte wurden in die gegebenen Vektoren inseriert, was zu den Plasmiden pCgM4, pgM4R, pgM4Del1 oder pgM4Del2 führte, wie angegeben. Die Anordnung eines Fragments innerhalb

des EHV-4-Genoms ist relativ zur Sequenz, die von Telford et al. (1998) bestimmt wurde, angegeben.

Figur 9: Western-Blot-Analyse von Pferdeseren.

Lysate von EHV-1 gM-exprimierenden Zelllinien ccgM und von Rk13-Zellen wurden entweder für 2 min oder auf 56°C (1,2) oder 5 min auf 95°C (3) erwärmt (gM ist hochgradig hydrophob, und es ist bekannt, dass es beim Kochen aggregiert, so dass es nicht mehr in das trennende Gel eintritt). Identische Blots wurden mit verschiedenen Pferdeseren (1:3000) oder dem anti-gM-Kaninchenserum inkubiert. Pfeile bezeichnen gM-spezifische Reaktivität in gekochten und ungekochten Proben. Neutralisierende Testtiter (NT) sind für Seren angegeben, die von einer virologischen diagnostischen Einheit erhalten wurden.

### **Darstellung der Erfindung**

Definitionen von Ausdrücken, die in der Beschreibung verwendet werden:

Vor den Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung ist darauf hinzuweisen, dass, wie hier und in den beigefügten Ansprüchen verwendet, die Singularformen "ein/eine" und "der/die/das" Pluralbezugnahmen umfassen, sofern der Zusammenhang nicht klar etwas anderes vorschreibt. So schließt z.B. die Bezugnahme auf "ein EHV-Virus" eine Mehrzahl derartiger EHV-Viren ein, umfassend auch alle Subspezies, wie EHV1, 4 und andere; die Bezugnahme auf die "Zelle" ist eine Bezugnahme auf eine oder mehrere Zellen und Äquivalente davon, die dem Fachmann bekannt sind, usw. Sofern nicht anders definiert, haben alle technischen und wissenschaftlichen Ausdrücke, die hier verwendet werden, die gleichen Bedeutungen, wie sie üblicherweise vom Fachmann auf dem Gebiet, zu dem die Erfindung gehört, verstanden werden. Obgleich beliebige Methoden und Materialien ähnlich oder äquivalent zu denen, die hier beschrieben sind, zur Ausführung oder zum Testen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, werden die bevorzugten Verfahren, Vorrichtungen und Materialien nun beschrieben. Alle Veröffentlichungen, die hier genannt werden, werden durch Verweis zum Zweck der Beschreibung und Offenbarung von Zelllinien, Vektoren und Methoden, wie sie in

den Veröffentlichungen berichtet werden, die im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, zum Gegenstand der vorliegenden Anmeldung gemacht. Nichts hierin ist so auszulegen, dass zugegeben wird, dass die Erfindung nicht berechtigt ist, aufgrund früherer Erfindung vor derartiger Offenbarung zu datieren.

Der Ausdruck "EHV", wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf alle Pferde-Herpesviren, wie die Spezies EHV-1 und EHV-4, innerhalb der Familie Alphaherpesvirinae. Die Ausdrücke EH-Virus, EH Virus, EHV Virus, EHV-Virus und EHV beziehen sich alle auf Pferde-Herpesviren.

Virulenz: "Virulenz", wie hier verwendet, bezieht sich auf ein EH-Virus, das zur Propagation in Zielwirtsspezies (d.h. Pferden) mit dem Potential zur Induktion subklinischer und klinischer Erkrankung, gekennzeichnet durch Atemwegssymptome, Aborte oder neurologische Störungen, imstande ist. Beispiele für virulentes EHV sind Wildtypviren, die starke klinische Symptome induzieren. Beispiele für Virulenzfaktoren sind Hämolysine (die rote Blutzellen lysieren) und Adhäsine (Proteine, durch die das Pathogen am Wirt haften und Kolonisierung oder Invasion initiieren kann). Genauer gesagt bedeutet "Virulenz" hier, dass das gM-Genprodukt, ein Hauptbestandteil der Virushülle, dem Virus das Eindringen in den Wirt ermöglicht und an der Zell-zu-Zell-Ausbreitung beteiligt ist.

Abschwächung: "Ein abgeschwächtes EH-Virus", wie hier verwendet, bezieht sich auf ein infektiöses EHV, das keine EHV-assoziierte subklinische oder klinische Erkrankung hervorruft. Insbesondere sind erfindungsgemäß derartige abgeschwächte EH-Viren EHV, die eine Replikation eingehen können und nicht gM exprimieren.

Eine "funktionelle Variante" des erfindungsgemäßen EH-Virus ist EHV-Virus, das eine biologische Aktivität (entweder funktionell oder strukturell) besitzt, die im Wesentlichen ähnlich zu dem erfindungsgemäßen EHV ist. Der Ausdruck "funktionelle Variante" umfasst auch "ein Fragment", "eine funktionelle Variante", "eine



Variante basierend auf dem degenerativen Nucleinsäure-Code" oder "ein chemisches Derivat". Eine derartige "funktionelle Variante" kann beispielsweise eine oder mehrere Nucleinsäureaustausche, Deletionen oder Insertionen tragen. Diese Austausche, Deletionen oder Insertionen können 10% der Gesamtsequenz ausmachen. Die funktionelle Variante behält zumindest teilweise ihre biologische Aktivität, z.B. die Funktion als ein infektiöser Klon oder ein Vaccin-Stamm, oder zeigt sogar verbesserte biologische Aktivität.

Eine "Variante, basierend auf der degenerativen Natur des genetischen Codes" ist eine Variante, die aus der Tatsache resultiert, dass eine bestimmte Aminosäure von mehreren verschiedenen Nucleotid-Triplets kodiert werden kann. Diese Variante behält zumindest zum Teil ihre biologische Aktivität oder zeigt sogar verbesserte biologische Aktivität.

Ein "Fusionsmolekül" kann ein DNA-Molekül oder infektiöses EHV-Virus entsprechend der Erfindung in Fusion z.B. an einen Reporter, wie eine Radiomarkierung, ein chemisches Molekül, wie eine fluoreszierende Markierung oder ein beliebiges anderes Molekül, das auf diesem Gebiet bekannt ist, sein.

Wie hier verwendet, ist ein "chemisches Derivat" entsprechend der Erfindung ein DNA-Molekül oder ein infektiöser EHV-Klon entsprechend der Erfindung, chemisch modifiziert oder enthaltend zusätzliche chemische Anteile, die nicht normalerweise Bestandteil des Moleküls sind. Derartige Anteile können die Löslichkeit, Absorption, biologische Halbwertszeit und dgl. des Moleküls verbessern.

Ein Molekül ist "im Wesentlichen ähnlich" zu einem anderen Molekül, wenn beide Moleküle im Wesentlichen ähnliche Nucleotidsequenzen oder biologische Aktivität aufweisen. Wenn also zwei Moleküle eine ähnliche Aktivität aufweisen, dann werden sie als Varianten angesehen, da dieser Ausdruck hier verwendet wird, wenn die Nucleotidsequenz nicht identisch ist, und zwei Moleküle, die eine ähnliche Nucleotidsequenz aufweisen, werden als Varianten angesehen, da dieser Ausdruck hier verwendet wird, selbst wenn ihre biologische Aktivität nicht identisch ist.

Der Ausdruck "Vaccin" bezieht sich, wie hier verwendet, auf eine pharmazeutische Zusammensetzung, die mindestens eine immunologisch aktive Komponente, die eine immunologische Reaktion in einem Tier induziert, und möglicherweise, jedoch nicht notwendig, eine oder mehrere zusätzliche Komponenten, die die immunologische Aktivität der aktiven Komponente verstärken, umfasst. Ein Vaccin kann zusätzlich weitere Komponenten, die für pharmazeutische Zusammensetzungen typisch sind, umfassen. Die immunologisch aktive Komponente eines Vaccins kann vollständige Viruspartikel entweder in originaler Form oder als abgeschwächte Partikel in einem sogenannten modifizierten Lebendvaccin (MLV) oder Partikel, die nach geeigneten Verfahren inaktiviert wurden, in einem sogenannten abgetöteten Vaccin (kV) umfassen. In einer anderen Form kann die immunologisch aktive Komponente eines Vaccins geeignete Elemente der Organismen umfassen (Untereinheiten-Vaccine), wobei diese Elemente erzeugt werden durch Zerstörung der ganzen Partikel oder Züchtung von Kulturen, die derartige Partikel enthalten, und gegebenenfalls anschließende Reinigungsstufen, die die gewünschte(n) Struktur(en) ergeben, oder durch synthetische Verfahren unter Einschluss geeigneter Manipulation durch Verwendung eines geeigneten Systems z.B. auf der Basis von Bakterien, Insekten, Säugern oder anderen Spezies plus gegebenenfalls anschließende Isolierungs- und Reinigungsverfahren oder durch Induktion der synthetischen Prozesse in dem Tier, das ein Vaccin benötigt, durch direkte Einverleibung des genetischen Materials unter Verwendung geeigneter pharmazeutischer Zusammensetzungen (PolyNucleotid-Vaccinierung). Ein Vaccin kann eines oder gleichzeitig mehr als eines der vorstehend beschriebenen Elemente umfassen.

Der Ausdruck "Vaccin", wie er hier verstanden wird, ist ein Vaccin für die Veterinärverwendung, umfassend antigene Substanzen, und wird verabreicht für den Zweck der Induktion einer spezifischen und aktiven Immunität gegen eine Krankheit, die durch EHV hervorgerufen wird. Das EHV-Vaccin entsprechend der Erfindung verleiht aktive Immunität, die passiv über Antikörper der Mutter gegen die Immunogene, die es enthält, und gelegentlich auch gegen antigen verwandte Organismen übertragen werden kann.

Zusätzliche Komponenten zur Verstärkung der Immunreaktion sind Bestandteile, die üblicherweise als Adjuvantien bezeichnet werden, wie z.B. Aluminiumhydroxid, Mineral- oder andere Öle oder Hilfsmoleküle, die zu dem Vaccin gegeben oder vom Körper nach der entsprechenden Induktion durch derartige zusätzliche Komponenten erzeugt werden, wie, ohne Beschränkung hierauf, Interferone, Interleukine oder Wachstumsfaktoren.

Eine "Vaccin-Zusammensetzung oder pharmazeutische Zusammensetzung" besteht im Wesentlichen aus einem oder mehreren Bestandteilen, die zur Modifizierung physiologischer, z.B immunologischer Funktionen, des Organismus, dem sie verabreicht wird, oder von Organismen, die in oder auf dem Organismus leben, geeignet sind. Der Ausdruck umfasst, ohne Beschränkung hierauf, Antibiotika und Antiparasitika sowie andere Bestandteile, die üblicherweise verwendet werden, um bestimmte andere Zwecke zu erzielen, wie, jedoch ohne Beschränkung hierauf, Verarbeitungsmerkmale, Sterilität, Stabilität, Einfachheit der Verabreichung der Zusammensetzung auf enteralem oder parenteralem, wie oralem, intravenösem, intranasalem, intramuskulärerem, subkutanem, intradermale oder anderem geeigneten Weg, Toleranz nach Verabreichung, kontrollierte Freisetzungseigenschaften.

#### Darstellung der Erfindung

Die Lösung des vorstehend genannten technischen Problems wird durch die Beschreibung und die Ausführungsformen, die in den Ansprüchen charakterisiert sind, erzielt.

Die Erfindung überwindet die Schwierigkeiten und das Vorurteil auf diesem Gebiet, dass ein Pferde-Herpesvirus nicht frei von Fremdsequenzen erzeugt werden kann. Unter Anwendung der erfindungsgemäßen Verfahren werden EH-Viren überlegener Qualität für die Verwendung in Vaccinen bereitgestellt. Die zentrale kodierende Sequenz für das Protein gM wird auf solche Weise eliminiert, dass die verbleibenden gM-carboxyterminalen Sequenzen sich in einem anderen Leserahmen als die amino-

terminalen Sequenzen befinden. Das benachbarte Gen für das essentielle Protein UL9-Homologes (Gen 53), dessen Orientierung und Überlappung mit dem Gen, das für das Protein gM kodiert, macht es erforderlich, dass eine minimale Nucleotidsequenz für das Gen gM verbleiben muss, um die Expression des Gens 53 zu erlauben und damit Lebensfähigkeit des Virus zu erzielen. Daher bezieht sich ein erfindungsgemäßes EHV auf EHV's, die dadurch gekennzeichnet sind, dass das Gen, das für das Protein gM kodiert, in solcher Weise deletiert ist, dass die Expression des Gens, das für das UL9-Homologe (Gen 53) kodiert, nicht beeinflusst ist. Der Ausdruck "nicht beeinflusst" bezieht sich nicht auf bestimmte quantitative oder qualitative Eigenschaften von UL9, sondern bedeutet einfach, dass die Expression des Gens nicht beeinflusst ist, solange das Protein von dem Virus exprimiert wird und in einer im Wesentlichen ausreichenden Menge für die Lebensfähigkeit des Virus vorhanden ist.

Der lange bestehende Bedarf auf diesem Gebiet an einem Vaccin, das rekombinantes Pferde-Herpesvirus 4 umfasst, wurde durch die Erfinder befriedigt, die wesentliche Schwierigkeiten auf diesem Gebiet überwand. Die erfindungsgemäßen Viren EHV-1 und EHV-4 können vorteilhafterweise z.B. für die Verwendung in einem Vaccin verwendet werden.

Eine erste wichtige Ausführungsform der Erfindung bezieht sich daher auf ein Pferde-Herpesvirus (EHV), worin das Gen, das das Protein gM kodiert, und damit gM selbst abwesend ist, dadurch gekennzeichnet ist, dass es frei von heterologen Elementen ist. "Frei von heterologen Elementen" bedeutet, dass keine Fremdsequenz, d.h. keine Nicht-EHV-Sequenz, wie eine lacZ- oder GFP-kodierende Kassette, in der kodierenden Sequenz für das erfindungsgemäße Virus vorhanden ist (ein so genannter "weißer Klon"). Das erfindungsgemäße EHV wird also vollständig von EHV-Sequenzen kodiert. Das erfindungsgemäße EHV ist frei von bakteriellen Elementen oder Nucleinsäuren, die derartige bakterielle Elemente kodieren. Ferner ist fast die gesamte kodierende Sequenz für das gM-Protein und damit das kodierte vorstehend genannte gM-Protein eliminiert. Vorzugsweise ist das erfindungsgemäße EHV also dadurch gekennzeichnet, dass das Protein gM aufgrund einer Deletion des

Gens, das für das Protein gM kodiert, abwesend ist. Wie vorstehend dargelegt, erfordert "das Gen, das das Protein gM kodiert, ist abwesend" jedoch auch, dass eine minimale gM-Sequenz verbleibt, so dass mindestens die überlappende Gen 53-Sequenz noch vorhanden ist, wobei die restlichen gM-Sequenzen deletiert sein können (siehe unten). Dies kann durch molekularbiologische Techniken erzielt werden (siehe unten), so dass das rekombinante EHV erzeugt wird.

Die Verwendung von lacZ als ein Marker für die erfolgreiche Deletion des gM-Gens von EHV-1 oder 4 führte nicht zur erfolgreichen Erzeugung erfindungsgemäßer Viren (vgl. Beispiele 1, 2). Die Erfinder haben daher ein erfindungsgemäßes Verfahren entwickelt, um das Virus zu erhalten. Ein EH-Virus wurde konstruiert, bei dem das gM-Gen durch Insertion einer Kassette, die den GFP-Marker enthält, deletiert war. Dieser Ansatz erlaubte überraschenderweise die Unterscheidung zwischen Ausgangsvirus (grüne fluoreszierende Plaques) und neuen rekombinanten Plaques (nicht fluoreszierende Plaques).

Bevorzugt ist ein EHV, das nach einem Verfahren erhältlich ist, das folgende Stufen umfasst:

- a) Isolierung eines Wildtyp-EHV;
- b) Etablierung eines Plasmids, das für das EHV-gM-Gen kodiert, gegebenenfalls mit flankierenden Sequenzen;
- c) Erzeugung einer komplementierenden Zelllinie, die gM oder Teile davon exprimiert;
- d) Etablierung eines EH-Virus, das ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert in seiner gM kodierender Sequenz trägt, durch Cotransfektion der komplementierenden Zelllinie von Stufe b) mit EHV-Nucleinsäure und einem Plasmid, das gM kodiert, das durch ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert unterbrochen ist;
- e) Deletion der GFP-kodierenden Kassette; und
- f) Selektion auf die EHV-Klone, bei denen die GFP-kodierende Kassette erfolgreich deletiert ist.

"lacZ" ist dem Fachmann als das Gen, das  $\beta$ -Galactosidase kodiert, bekannt. Erfindungsgemäß bezieht sich "GFP" auf grünes fluoreszierendes Protein (GFP), das von einer biolumineszierenden Qualle gebildet wird (Chalfie et al., 1994).

"Komplementierende Zelllinie" bezieht sich auf eine Zelllinie, in die ein Gen, das normalerweise in dem Zellliniengenom nicht vorhanden ist, eingeführt ist, wobei es konstitutiv exprimiert wird. Geeignete Zelllinien umfassen, jedoch ohne Beschränkung hierauf, Kaninchennierenzelllinie Rk13, Zelllinie cc (Seyboldt et al., 2000) und die Vero-Zelllinien (ATCC Katalog # CRL-1586), wie Klon 1008, wie auch in den Beispielen 1 und 2 offenbart, sowie beliebige andere Zelllinien, die dem Fachmann bekannt sind. Üblicherweise kann sie auf Zellklone selektiert werden, die dieses zusätzliche Protein exprimieren. Diese Zelllinie exprimiert das Gen, das in dem Virus deletiert ist, wobei dieser Mangel komplementiert wird, und ermöglicht das Wachstum des Virus nach der Gendeletion.

Molekularbiologische Standardverfahren unter Verwendung von Restriktionsenzymen, Ligation, PCR, Transfektion und dgl. sind auf diesem Gebiet bekannt (vgl. z.B. Sambrook et al. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York).

Vorzugsweise ist ein derartiges erfindungsgemäßes EHV dadurch gekennzeichnet, dass es sich um EHV-1 handelt. Stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass 850 bis 1.100 bp des 1.332 bp umfassenden offenen Leserahmens für gM deletiert sind. Noch stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass 900 bis 1.000 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind. Ebenfalls stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass 960 bis 970 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind (960, 961, 962, 963, 964, 965, 966, 967, 968, 969 oder 970 bp). Am stärksten bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass 962 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind.

Stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM mit Ausnahme von 150 bis 200 Basenpaaren (bp) der kodierenden Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt von gM, und 150 bis 250 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, deletiert sind. Gemäß dieser stärker bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 93118-93267 bis 93118-93317 der Sequenz, die den C-terminalen Abschnitt von gM kodiert, und Nucleotide 94223-94472 bis 94323-94472 der kodierenden Sequenz, die den N-terminalen Abschnitt von gM kodiert, verbleiben. Stärker bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-1, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Nucleotide 93268-93318 bis 94222-94322 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1992). Innerhalb der angegebenen Bereiche kann eine beliebige Anzahl von Nucleotiden deletiert sein. Erfindungsgemäß können die Deletionen also bei einer Position nicht niedriger als Nucleotidposition 93268 beginnen, müssen jedoch bei Position 93318 beginnen. Die Deletion kann schon bei Position 94222, nicht jedoch später als Position 94322, enden. Ein bevorzugtes erfindungsgemäßes EHV-1 ist also dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 93268 bis 94322 der gM kodierenden Sequenz entsprechend den Telford-Positionen (1992) deletiert sind. Beliebige Kombinationen liegen innerhalb des Umfangs der Erfindung, wie 93272 bis 94312, 93300 bis 94300 usw.

Noch stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM mit Ausnahme von 160 bis 190 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt von gM, und 190 bis 220 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, deletiert ist. Gemäß dieser stärker bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 93118-93277 bis 93118-93307 der Sequenz, die den C-terminalen Abschnitt in gM kodiert, und Nucleotide für 94253-94472 bis 94273-94472 der kodierenden Sequenz, die den N-terminalen Abschnitt von gM kodiert, verbleiben. Stärker bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-1, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Nucleotide 93278-93308 bis 94252-94282 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1992).

Ebenfalls stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM deletiert ist, mit der Ausnahme von 180 bis 190 (180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190) bp der kodierenden Sequenz, die den C-terminalen Abschnitt der gM kodierenden Sequenz kodiert, und 200 bis 210 (200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209 oder 210) bp der kodierenden Sequenz, die den N-terminalen Abschnitt von gM kodiert. Gemäß dieser stärker bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 93118-93297 bis 93118-93307 (93297, 93298, 93299, 93300, 93301, 93302, 93303, 93304, 93305, 93306, 93307) der Sequenz, die den C-terminalen Abschnitt von gM kodiert, und Nucleotide 94263-94472 bis 94273-94472 (94263, 94264, 94265, 94266, 94267, 94268, 94269, 94270, 94271, 94272, 94273) der kodierenden Sequenz, die den N-terminalen Abschnitt von gM kodiert, verbleiben. Stärker bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-1, das dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 94298-94308 bis 94262-94272 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1992). Dies bedeutet, dass beliebige Nucleotide innerhalb der vorstehend angegebenen verbleibenden Nucleotide erfindungsgemäß deletiert werden können, z.B. Nucleotide 94299-94263 oder 94299-94264 oder 94300-94272 oder beliebige Kombinationen davon.

Am stärksten bevorzugt ist das erfindungsgemäß EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM mit Ausnahme von 184 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt der gM kodierenden Sequenz, und 209 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, deletiert ist. Gemäß dieser am stärksten bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 93118-93301 der Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt von gM, und Nucleotide 94264-94472 der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, verbleiben. Am stärksten bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-1, das dadurch gekennzeichnet ist, dass die Nucleotide 94263 bis 93302 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1992). Gemäß dieser am stärksten bevorzugten Ausführungsform sind 962 Nucleotide der Sequenz, die gM



kodiert, deletiert. Dies wird in nicht beschränkender Weise in Beispiel 1 beispielhaft veranschaulicht.

Ebenfalls stärker bevorzugt ist ein EHV-1, das dadurch gekennzeichnet ist, dass gM deletiert ist und dass es frei von heterologen Elementen ist und dass es sich um eine rekombinante Variante auf der Basis eines Stammes handelt, ausgewählt aus der Gruppe AB69 (ATCC VR2581), EHV-1 Ts-Mutante ECACC V99061001, KyA, KyD, Ab1, Ab4, RacH, RacL11 oder RacM von EHV-1, und dass keine heterologen Elemente, wie GFP- oder lac-Elemente, vorhanden sind. Ebenfalls stärker bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass gM deletiert ist und dass es frei von heterologen Elementen, wie GFP- oder lac-Z-Elementen ist, und dass es sich um eine rekombinante Variante auf der Basis von Stamm RacH von EHV-1 handelt. Am stärksten bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass gM deletiert ist und dass es frei von heterologen Elementen, wie GFP- oder lacZ-Elementen, ist und dass es sich um die RacH-basierte rekombinante Variante Isolierung HΔgM-w, wie in Beispiel 1 offenbart, handelt. Besagtes erfindungsgemäßes EHV-1 HΔgM-w ist beim „Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR) and European Collection of Cell Cultures (ECACC)“, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK, als Patenthinterlegung nach dem Budapest Vertrag hinterlegt. Das Hinterlegungsdatum war der 16.10.2002, die vorläufige Bezeichnung H-delta-gM-w, und die Hinterlegungsnummer 02101663. Ebenfalls bevorzugt sind EHV-1, die alle charakterisierenden Eigenschaften des besagten hinterlegten EHV-1 aufweisen.

Alle vorstehend genannten EHV-1 weisen überlegene Eigenschaften gegenüber Viren mit heterologen Elementen, wie GFP, auf. Die erfindungsgemäßen EHV-1 weisen eine vorteilhaft höhere extrazelluläre Infektivität als die, die noch heterologe Elemente umfassen, auf. Dies wird beispielhaft in Figur 5 veranschaulicht (z.B. zwischen 4 und 12 Stunden).

Bis die vorliegende Erfindung gemacht wurde, war niemand auf diesem Gebiet in der Lage, ein rekombinantes EHV-4-Virus zu erzeugen, das als ein Vaccin verwendet werden kann. EHV-1 und EHV-4 sind homolog und kreuzreagierend bis zu einem

gewissen Grad. Es gab jedoch einen lange bestehenden Bedarf auf diesem Gebiet an abgeschwächten EHV-4-Viren, da EHV-1 offensichtlich nicht für einen ausreichenden Schutz gegen eine EHV-4-Infektion sorgt. Ein erfindungsgemäßes EHV ist also vorzugsweise dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein EHV-4 handelt. Stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass 900 bis 1150 bp des offenen Leserahmens für gM von 1332 bp deletiert sind. Noch stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass 1000 bis 1150 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind. Ebenfalls stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass 1110 bis 1115 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind (1110, 1111, 1112, 1113, 1114 oder 1115 bp). Am stärksten bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-1 dadurch gekennzeichnet, dass 1110 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind.

Stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM mit Ausnahme von 0 bis 50 Basenpaaren (bp) der kodierenden Sequenz, die den C-terminalen Abschnitt von gM kodiert, und 150 bis 250 bp der kodierenden Sequenz, die den N-terminalen Abschnitt von gM kodiert, deletiert ist. Gemäß dieser stärker bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 92681-92680 bis 92681-92730 der Sequenz, die den C-terminalen Abschnitt von gM kodiert, und Nucleotide 93766-94033 bis 93866-94033 der kodierenden Sequenz, die den N-terminalen Abschnitt von gM kodiert, verbleiben. Stärker bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-4, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Nucleotide 92681-92731 bis 93765-93865 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1998). Innerhalb der gegebenen Bereiche kann eine beliebige Anzahl an Nucleotiden deletiert werden. Erfindungsgemäß können die Deletionen also nicht bei einer niedrigeren Position als Nucleotidposition 92681 beginnen, müssen jedoch bei Position 92731 beginnen. Die Deletion kann schon bei Position 93765 enden, nicht jedoch später als Position 93865. Vorzugsweise ist ein erfindungsgemäßes EHV-4 also dadurch gekennzeichnet, dass Nucleotide 92681 bis 93865 der gM kodierenden Sequenz entsprechend den Telford-Positionen (1998) deletiert sind. Beliebige

Kombinationen liegen innerhalb des Umfangs der Erfindung, wie 92672 bis 93801, 92700 bis 93800 und dgl.

Noch stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM mit Ausnahme von 10 bis 40 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt von gM, und 190 bis 220 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, deletiert ist. Gemäß dieser stärker bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 92681-92690 bis 92681-92720 der Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt von gM, und Nucleotide von 93806-94033 bis 93836-94033 der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, verbleiben. Stärker bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-4, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Nucleotide 92691-92721 bis 93805-93835 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1998).

Ebenfalls stärker bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM deletiert ist mit Ausnahme von 30 bis 40 (30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39 oder 40) bp der kodierenden Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt der gM kodierenden Sequenz, und 200 bis 210 (200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209 oder 210) bp der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM. Gemäß dieser stärker bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 92681-92710 bis 92681-92720 (92710, 92711, 92712, 92713, 92714, 92715, 92716, 92717, 92718, 92719, 92720) der Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt von gM, und Nucleotide 93816-94033 bis 93826-94033 (93824, 93825, 93826, 93827, 93828, 93829, 93830, 93831, 93832, 93833, 93834) der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, verbleiben. Stärker bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-4, das dadurch gekennzeichnet ist, dass Nucleotide 92711-92721 bis 93823-93833 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1998). Dies bedeutet, dass beliebige Nucleotide innerhalb der vorstehend genannten

verbleibenden Nucleotide erfindungsgemäß deletiert werden können, z.B. Nucleotide 94299-94257 oder 94299-94256 oder 94300-94257 oder beliebige Kombinationen davon.

Am stärksten bevorzugt ist das erfindungsgemäße EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass die kodierende Sequenz für gM mit der Ausnahme von 34 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt der gM kodierenden Sequenz, und 209 bp der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, deletiert ist. Gemäß dieser am stärksten bevorzugten Ausführungsform ist die kodierende Sequenz von gM deletiert; nur Nucleotide 92681-92714 der Sequenz, kodierend den C-terminalen Abschnitt von gM, und Nucleotide 93825-94033 der kodierenden Sequenz, kodierend den N-terminalen Abschnitt von gM, verbleiben. Am stärksten bevorzugt ist also ein erfindungsgemäßes EHV-4, das dadurch gekennzeichnet, dass Nucleotide 92715-93824 (kodierend den Kernabschnitt von gM) deletiert sind (Numerierung nach Telford, 1998). Gemäß dieser am stärksten bevorzugten Ausführungsform sind 1110 Nucleotide der gM kodierenden Sequenz deletiert. Dies wird beispielhaft in nicht beschränkender Weise in Beispiel 2 veranschaulicht.

Ebenfalls stärker bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes EHV-4, das dadurch gekennzeichnet ist, dass gM deletiert ist und dass es frei von heterologen Elementen, wie GFP- oder lacZ-Elementen, ist und dass es eine rekombinante Variante, basierend auf dem Stamm MSV Lot 071398 von EHV-4, ist. Am stärksten bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes EHV-4 dadurch gekennzeichnet, dass gM deletiert ist und dass es frei von heterologen Elementen, wie GFP- oder lacZ-Elementen, ist und dass es auf Stamm MSV Lot 071398 und Isolierung E4ΔgM-4, wie in Beispiel 2 offenbart, basiert. Besagtes erfindungsgemäßes EHV-4 ist beim „Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR) and European Collection of Cell Cultures (ECACC)“, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK, als Patenthinterlegung nach dem Budapest Vertrag hinterlegt. Das Hinterlegungsdatum war der 14.01.2003, die vorläufige Bezeichnung EHV-4, und die Hinterlegungsnummer 03011401. Ebenfalls

bevorzugt sind EHV-4, die alle charakterisierenden Eigenschaften des besagten hinterlegten EHV-1 aufweisen.

Alle vorstehend genannten EHV-4 weisen überlegene Eigenschaften gegenüber Viren, die im Stand der Technik bekannt sind, auf, da keine rekombinanten EHV-4 im Stand der Technik verfügbar sind. Ferner weist das erfindungsgemäße EHV-4 eine vorteilhaft höhere extrazelluläre Infektivität als solche, die noch heterologe Elemente, wie GFP, umfassen, auf. Dies wird beispielhaft in Figur 10 veranschaulicht (z.B. nach 24 Stunden).

Ein weiteres wichtiges Element der Erfindung ist eine Nucleinsäure, die für ein EHV, wie vorstehend offenbart, kodiert. Der Fachmann kann leicht die entsprechende Sequenz durch molekularbiologische Standardverfahren, die auf diesem Gebiet bekannt sind, bestimmen.

Es gab eine spezielle Schwierigkeit auf diesem Gebiet, das erfindungsgemäße EHV zu erhalten. Die Erfinder konstruierten gM-negative EHV-Viren durch Einführung eines Markergens (lacZ) in das gM-Gen. Bei dem Versuch, diese Kassette zu entfernen, enthielten bei sowohl EHV-1- als auch EHV-4-Mutanten, die durch lacZ-Insertion erzeugt wurden, alle Klone, die phenotypisch lacZ-negativ waren, noch die lacZ-Kassette. Die Erfinder entwickelten daher ein erfinderisches Verfahren, um die Viren zu erhalten. Ein EH-Virus wurde konstruiert, bei dem das gM-Gen durch Insertion einer Kassette, die den GFP-Marker enthielt, deletiert wurde. Dieser Ansatz erlaubte überraschend die Unterscheidung zwischen Ausgangsvirus (grüne fluoreszierende Plaques) und neuen rekombinanten Plaques (nicht fluoreszierende Plaques). Außerdem wurde eine Vero-Zelllinie (auf der Basis von Vero-Zellklon 1008), die konstitutiv EHV4-gM exprimiert, von den Erfindern erzeugt, um die Schwierigkeiten auf diesem Gebiet zu überwinden. Die Zelllinie wurde durch Transfektion des entsprechenden gM-Gens und anschließende Selektion auf gM exprimierende Vero-Zellen erzeugt. Nur diese Zellen ermöglichten es den Erfindern, EHV4-gM-negative Viren zu replizieren. Besagte gM-komplementierende Vero-Zelllinie ist beim „Centre for Applied Microbiology and Research (CAMR) and European Collection of Cell Cultures (ECACC)“, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK,

als Patenthinterlegung nach dem Budapest Vertrag hinterlegt. Das Hinterlegungsdatum war der 28.01.2003, die vorläufige Bezeichnung VERO GM, und die Hinterlegungsnummer 03012801. Ebenfalls bevorzugt sind Zelllinien, die alle charakterisierenden Eigenschaften der besagten hinterlegten VERO GM Zelllinie aufweisen.

Bevorzugt ist ein Verfahren, um ein rekombinantes EHV zu erhalten, das folgende Stufen umfasst:

- a) Isolierung eines Wildtyp-EHV;
- b) Etablierung eines Plasmids, das das EHV gM-Gen kodiert, gegebenenfalls mit flankierenden Sequenzen;
- c) Erzeugung einer komplementierenden Zelllinie, die gM oder Teile davon exprimiert;
- d) Etablierung eines EH-Virus, das ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert in seiner gM kodierenden Sequenz trägt, durch Cotransfektion der komplementierenden Zelllinie von Stufe b) mit der EHV-Nucleinsäure und einem Plasmid, das gM kodiert, das durch ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert unterbrochen ist;
- e) Deletion der GFP-kodierenden Kasette; und
- f) Selektion auf die EHV-Klone, bei denen die GFP-kodierende Kasette erfolgreich deletiert ist.

Die vorstehend bezeichneten Zellen sind eine wichtige Ausführungsform der vorliegenden Erfindung. Die Erfindung bezieht sich also auf eine Zelllinie für die Verwendung bei einem erfindungsgemäßen Verfahren, die dadurch gekennzeichnet ist, dass das Gen, das das Protein gM kodiert, in die Zelllinie transfiziert wird und dass die Zelllinie gM exprimiert. Die Erfindung bezieht sich vorzugsweise auf eine erfindungsgemäße Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Zelllinie handelt, die aus der Gruppe Vero-Zellen (Vero-gM-Zellen), RK-13 und cc (cc-gM) ausgewählt ist.

Wie vorstehend für EHV-1 offenbart, führte die Verwendung von lacZ als ein Marker anstelle von GFP auch bei EHV-4 nicht zur erfolgreichen Erzeugung von erfindungsgemäßen Viren (vgl. in nicht beschränkender Weise Beispiel 2). "LacZ-positive" Zellen wurden allgemein weniger intensiv bei Vero-Zellen als bei Rk13-Zellen angefärbt und waren daher schwerer zu identifizieren, und das EHV-4-System zeigte eine langsamere Replikation als EHV-1 und ergab damit weniger Zeit zwischen Plaque-Identifizierung und Isolierung von lebensfähigen Virusnachkommen. Die Verwendung von GFP stellte daher den einzigen Weg dar, um das EHV-4-Virus zu erhalten. Das Verfahren wurde durchgeführt, wie vorstehend für EHV-1 beschrieben, und führte überraschenderweise ebenfalls zur erfolgreichen Identifizierung von EHV-4 gM-deletiertem Virus aufgrund der Identifizierung fluoreszierender Plaques.

Die Isolierung des Wildtyp-EHV erfolgt durch Gewinnung von Lungengewebe bei Nekropsie von Tieren, die im Verdacht stehen, an EHV erkrankt zu sein, und Isolierung von EHV aus Gewebezellen, wie auf diesem Gebiet bekannt. Die vollständige EHV 1-Genomsequenz ist von Telford et al. (1992) veröffentlicht worden. Entsprechend ist die vollständige Genom-Sequenz für EHV-4 von Telford et al. (1998) veröffentlicht worden. Die PCR-Amplifizierung von DNA-Sequenzen durch Verwendung von spezifischen Primern, die an komplementäre Stränge von Ziel-DNA, die DNA-Abschnitte von Interesse flankieren, binden, stellt ein molekularbiologisches Standardverfahren dar. Verfahren zur Ligation geeigneter DNA-Sequenzen in Plasmide, die für die beabsichtigten Konstruktionen geeignet sind, für die DNA-Transfektion in eukaryotische Zellen, für Southern-Blot- und Western-Blot-Analysen, für das gerichtete Ausschneiden von DNA-Fragmenten über Restriktionsenzyme und für die Selektion von Zelllinien, die gewünschte heterologe Gene oder Plasmide, die das gewünschte Gen oder Virus, in dem ein bestimmtes Gen deletiert ist, aufweisen, sind dem Fachmann bekannt. Molekularbiologische Standardverfahren, wie die vorstehend genannten Techniken, sind dem Fachmann bekannt und finden sich z.B. auch in Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, und Bertram, S. und Gassen, H.G.: Gentechnische Methoden, G. Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1991.

"Deletion" bedeutet die Entfernung eines oder mehrerer Nucleotide oder Aminosäuren.

Eine weitere wichtige Ausführungsform der Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung oder ein Vaccin, umfassend ein erfindungsgemäßes EHV, gegebenenfalls in Kombination mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Exzipienten.

Ebenfalls ein wichtiger Teil der vorliegenden Erfindung ist eine pharmazeutische Zusammensetzung, die eine erfindungsgemäße Nucleinsäure, wie vorstehend offenbart, umfasst.

Vorzugsweise bezieht sich ein erfindungsgemäßes Vaccin auf ein Vaccin, wie vorstehend definiert. Der Ausdruck "Lebendvaccin" bezieht sich auf ein Vaccin, das ein zur Replikation fähiges Partikel, insbesondere eine replikationsaktive virale Komponente, umfasst.

Vorzugsweise umfasst ein erfindungsgemäßes Vaccin ein erfindungsgemäßes gM-deletiertes EHV-1, wie vorstehend offenbart, in Kombination mit einem erfindungsgemäßen gM-deletierten EHV-4, wie vorstehend offenbart, oder gegebenenfalls einer beliebigen anderen antigenen Gruppe und gegebenenfalls einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Exzipienten. Das Vaccin kann als ein Kombinationsvaccin zum gleichen Zeitpunkt verabreicht werden. Am stärksten bevorzugt kann das erfindungsgemäße abgeschwächte EHV-1 zuerst verabreicht werden, gefolgt von einer Verabreichung eines erfindungsgemäßen abgeschwächten EHV-4 drei oder vier Wochen später. Ebenfalls am stärksten bevorzugt kann das erfindungsgemäße abgeschwächte EHV-1 in Kombination mit einem erfindungsgemäßen abgeschwächten EHV-4 in einem typischen Impfschema verabreicht werden, wobei zwei oder drei Basisimpfungen gegeben werden. Ein typisches Impfschema für ein derartiges Vaccin ist zwei Impfungen vier Wochen voneinander getrennt (Basisimpfung), gefolgt von regulären Auffrischungen alle sechs Monate. Die erfindungsgemäßen Vaccine,



wie vorstehend offenbart, können jedoch in unterschiedlichen Zeitintervallen, z.B. alle drei Monate, verabreicht werden.

Der Fachmann mag sich entscheiden, die Verabreichung in zwei oder mehr Anwendungen aufzuteilen, die kurz nacheinander verabreicht werden, oder zu irgendwelchen anderen festgelegten Intervallen. Vorzugsweise können solche Intervalle sein: erste Immunisierung, zweite Immunisierung ungefähr 4 Wochen anschließend und gegebenenfalls dritte Immunisierung 5 bis 6 Monate anschließend. Abhängig von der gewünschten Dauer und Wirksamkeit der Behandlung können die Vaccine einmal oder mehrere Male, auch intermittierend, verabreicht werden. Die erfindungsgemäßen Vaccine können an eine Stute vor der Zeugung und erneut während der Trächtigkeit verabreicht werden, um EHV-assoziierte Aborte zu verhindern. Andere Pferde können geimpft werden, z.B. einmal im Jahr. Fohlen können kurz nach der Geburt geimpft werden.

Die erfindungsgemäßen Vaccine können auf verschiedenen Verabreichungswegen, die dem Fachmann bekannt sind, insbesondere intravenöse Injektion oder direkte Injektion in Zielgewebe, verabreicht werden. Für die systemische Verabreichung sind intravenöse, intravaskuläre, intramuskuläre, intraarterielle, intraperitoneale, orale oder intramukosale (z.B. nasal oder respiratorisches Spray oder Injektion) Wege bevorzugt. Eine mehr lokale Anwendung kann subkutan, intrakutan, intrapulmonär oder direkt in das oder nahe dem Gewebe, das behandelt werden soll (Bindegewebe, Knochengewebe, Muskelgewebe, Nervengewebe, epitheliales Gewebe), bewirkt werden. Eine erfindungsgemäße Vaccin-Zusammensetzung kann auch über ein Implantat oder oral verabreicht werden. Am stärksten bevorzugt ist die intramuskuläre Verabreichung.

Für die Herstellung geeigneter Vaccin-Präparate für die vorstehend beschriebenen Anwendungen kann der Fachmann bekannte injizierbare, physiologisch annehmbare sterile Lösungen verwenden. Zur Herstellung einer gebrauchsfertigen Lösung für die parenterale Injektion oder Infusion sind wässrige isotone Lösungen, z.B. Kochsalzlösung oder entsprechende Plasmaproteinlösungen, ohne weiteres verfügbar. Die

Vaccin-Präparate können als Lyophilisate oder trockene Präparate vorliegen, die mit einer bekannten injizierbaren Lösung direkt vor der Verwendung unter sterilen Bedingungen rekonstituiert werden können, z.B. als ein Kit von Teilen. Die Endpräparate der erfindungsgemäßen Vaccin-Präparate werden für Injektion, Infusion oder Perfusion durch Mischen von gereinigtem erfindungsgemäßigem Virus mit einer sterilen physiologisch annehmbaren Lösung, die mit bekannten Trägersubstanzen oder/und Exzipienten ergänzt sein kann, hergestellt. Die angewandte Dosis der einzelnen erfindungsgemäßen EH-Viren, die in der Vaccin-Formulierung enthalten ist, liegt vorzugsweise zwischen  $10^4$  und  $10^8$  TCID<sub>50</sub>/pro Tier, zwischen  $10^5$  und  $10^7$  TCID<sub>50</sub>/pro Tier und insbesondere bei  $10^6$  TCID<sub>50</sub>/pro Tier.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung von erfindungsgemäßigem EHV bei der Herstellung eines Medikamentes für die Prophylaxe und/oder Behandlung von EHV-assoziierten Zuständen.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure bei der Herstellung eines Medikamentes für die Prophylaxe und/oder Behandlung von EHV-assoziierten Zuständen.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines Tiers, das dadurch gekennzeichnet ist, dass eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung dem Tier verabreicht und der therapeutische Erfolg überwacht wird.

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Behandlung eines EHV-infizierten Pferdeters mit einem erfindungsgemäßen gM-deletierten EHV, wie vorstehend beschrieben, wobei das abgeschwächte EHV oder die Vaccin-Zusammensetzung, wie vorstehend beschrieben, dem Pferdeter, das dessen bedarf, in einer geeigneten Dosis, die dem Fachmann bekannt ist, verabreicht wird und die Verringerung der EHV-Symptome, wie Virämie und Leukopenie und/oder Husten und/oder Pyrexie und/oder nasale Absonderung und/oder Diarrhoe und/oder Depression und/oder Abort, überwacht wird. Die Behandlung kann vorzugsweise wiederholt werden. Die Erfindung betrifft also ein Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines Tiers, das dadurch

gekennzeichnet ist, dass eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung dem Tier verabreicht wird und der therapeutische Erfolg überwacht wird. Die Behandlung kann durchgeführt werden, wie es vorstehend für die Vaccin-Zusammensetzung beschrieben wurde.

Die Erfindung betrifft vorzugsweise ein Verfahren zum Nachweis von Antikörpern gegen spezifische Strukturen von infizierenden EHV-1 oder EHV-4 und ein Verfahren zur Unterscheidung von Wildtyp-Infektionen vom Vorhandensein von gM-deletierten EHV-1 oder EHV-4, wie vorstehend beschrieben, nach einem immunologischen Verfahren. Immunologische Verfahren sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt und umfassen, jedoch unter Beschränkung hierauf, ELISAs (enzyme-linked immunosorbent assay) oder Sandwich-ELISAs, dot-blots, Immunoblots, Radioimmunoassays (Radioimmunoassay, RIA), Diffusions-basierte Ouchterlony-Tests, Rocket-Immunfluoreszenz-Assays oder Western-Blots. Beispiele für immunologische Verfahren werden z.B. beschrieben in: An Introduction to Radioimmunoassay and Related Techniques, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Niederlande (1986); Bullock et., Techniques in Immunocytochemistry, Academic Press, Orlando, FL, Bd. 1 (1982), Bd. 2 (1983), Bd. 3 (1985); Tijssen, Practice and Theory of Enzyme Immunoassays: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, Niederlande (1985).

Bei dem ELISA können immobilisiertes gM-Genprodukt oder ein Teil eines gM-Genprodukts oder beliebige andere EH-Virus 1- oder EH-Virus 4-Genprodukte auf einer Kunststoffoberfläche, die für ELISA-Analysen geeignet ist, verwendet werden; der ELISA ist jedoch nicht darauf beschränkt.

Ein erfindungsgemäßer ELISA umfasst folgende Stufen, ist jedoch nicht darauf beschränkt:

- a) Immobilisierung eines gM-Genprodukts oder eines Fragments davon auf einem Kunststoffträger;
- b) Spülen der Kunststoffoberfläche mit einem geeigneten Waschpuffer (z.B. PBS-Tween);

- c) Zugabe der Proben zu ausgewählten Vertiefungen und Inkubation der ELISA-Platte nach Standardverfahren;
- d) Waschen der Vertiefungen der ELISA-Platte und Zugabe eines geeigneten Antikörpers, gekoppelt an ein Enzym, wie HRP (Meerrettichperoxidase);

Nachweis von gebundenem Antikörper/HRP-Konjugat durch Zugabe eines geeigneten Substrats, gefolgt vom photometrischen Ablesen der optischen Dichte individueller Vertiefungen. Geeignete Antikörper, z.B. Kaninchen-anti-Pferde-Ig, sind auf diesem Gebiet bekannt.

Die nachstehenden Beispiele dienen der weiteren Erläuterung der Erfindung; die Beispiele sollen jedoch nicht so ausgelegt werden, dass sie den Umfang der hier offenbarten Erfindung beschränken.

## **BEISPIELE**

### **Beispiel 1: gM-deletierte EHV-1-Isolierungen**

Das gM-negative EHV-1 wurde konstruiert, indem entweder die *Escherichia coli* lacZ- (HΔgM-lacZ) oder die grünes fluoreszierendes Protein (GFP)-Expressionskassette (HΔgM-GFP) inseriert wurde, wobei 74,5% der gM-Gensequenzen ersetzt wurden. Die Expression eines Markerproteins erleichtert die Identifizierung und anschließende Reinigung eines rekombinanten Virus. Um das Vorhandensein jeglicher "Nicht-EHV-1-Sequenzen" innerhalb des Vaccin-Virus zu vermeiden, wurde entschieden, die Markergensequenzen zu entfernen und ein weiteres gM-negatives EHV-1 der zweiten Generation, ein "weißes" HΔgM (HΔgM-w), zu konstruieren.

Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pXuBaxA konstruiert (Figur 1). Zunächst wurde eine Rekombination von pXuBaxA-Sequenzen in das lacZ-markierte Virus HΔgM-lacZ versucht. In einer ersten Stufe wurden DNA-Transfektionen, die nach dem Calciumphosphatverfahren vermittelt waren, optimiert, so dass mehrere weiße Plaques nach Plattierung von 100 bis 1000 PFU von Transfektionsüberständen resultierten. In Folge wurden mehrere Plaques für die Reinigung von Nachkommen-virus gewählt und vier bis fünf Runden der Isolierung von Einzelplaques unterzogen.

Mehrere unabhängig isolierte phenotypisch lacZ-negative Viruspopulationen wurden genotypisch durch Southern-Blot analysiert, und es stellte sich heraus, dass sie noch Sequenzen der lacZ-Kassette trugen. Schwierigkeiten bei der Isolierung von wirklich lacZ-negativen Virus-Populationen aufgrund eines "lacZ-Silencing" waren vorhergesehen worden, und daher wurde eine große Zahl von phenotypisch lacZ-negativen Viruspopulationen gereinigt und analysiert, jedoch ohne Erfolg. Daher wurde die Strategie der Erzeugung eines "weißen" gM-negativen RaCh-Virus geändert, indem zu Cotransfektionen mit dem gM-negativen EHV-1, das durch Insertion einer GFP-Kassette konstruiert worden war, übergegangen wurde. Die Verwendung des GFP-exprimierenden Virus erleichterte die Unterscheidung zwischen Ausgangsvirus (grüne fluoreszierende Plaques) und neuen rekombinanten Viren (nicht fluoreszierende Plaques) und erhöhte damit die Wirksamkeit der Isolierung phenotypisch GFP-negativer Plaques. Es wurde nicht erwartet, dass die Änderung des gM-negativen "Ausgangs"-RaCh den Genotyp des erwarteten rekombinanten Virus beeinflussen würde, da (i) die beiden HΔgM-Viren der ersten Generation, abgesehen vom Marker, genetisch identisch sind und (ii) der schließliche Genotyp in der Region von Interesse durch das Rekombinationsplasmid (pXuBaxA) bestimmt wird.

Zur Konstruktion des Plasmid pXuBaxA (Konstrukt, das erforderlich ist, um das "weiße" gM-negative EHV-1 zu erhalten) wurde das 962 bp umfassende Apal-HincII-Fragment innerhalb des offenen Leserahmens von 1352 bp von EHV-1 gM aus dem Plasmid pBH3.1 entfernt (Figur 1D). Plasmid pBH3.1 trägt das EHV-1 BamHI-HindIII-Fragment, das das gM-Gen umgibt (Seyboldt et al., 2000). Um die Expression eines verkürzten gM-Produkts zu verhindern, wurden die Restriktionsendonukleasen Apal und HincII gewählt, so dass nach der Einstellung stumpfer Enden und Ligation die restlichen C-terminalen gM-Sequenzen (183 bp) nicht im Rahmen mit den restlichen N-terminalen Sequenzen (208 bp) waren.

Die EHV-1-gM-exprimierende Zelllinie ccgM (Seyboldt et al., 2000; erhalten von Dr. N. Osterrieder) wurde in minimal essentiell Medium, angereichert mit 5 - 10% fetalem Kälberserum (Biochrom,  $\gamma$ -bestrahlt), gehalten. Die homologe Rekombination

in EHV-1 wurde durch Calciumphosphat-vermittelte Cotransfektion von ccgM-Zellen mit 5-10 µg des Plasmids pXuBaxA (Figur 1D) und 2 µg DNA von HΔgM-lacZ bzw. HΔgM-GFP erzielt.

Die anschließende Analyse der DNA von HΔgM-GFP mit einer Digoxigenin-markierten Sonde, spezifisch für das BamHI-HindIII-Fragment des Plasmids pBH3.1 (Figur 2), zeigte

- (i) ein 2.757 bp- und ein 9.043 bp-Fragment bei BamHI,
- (ii) ein 10.006 bp- und ein 825 bp-Fragment bei HindIII,
- (iii) und ein 5.415 bp- und ein 4.474 bp-Fragment bei PstI-verdauter DNA.

Die verwendeten Restriktionsenzyme (BamHI, HindIII, PstI) schneiden nicht innerhalb von Sequenzen der GFP-Marker-Kassette, wodurch das Fragmentmuster relativ zur entsprechenden GFP-Marker-Kassette-freien DNA geändert wird.

Die GFP-Sonde band an die entsprechenden ersten Fragmente (i-iii) und wies keine GFP-spezifischen Sequenzen auf DNA von RacH oder von HΔgM-w nach.

Bei DNA von RacH wurden die erwarteten BamHI (11.166 bp), HindIII (10.199 bp) und PstI (9.257 bp)-Fragmente nachgewiesen, die in ihrer Größe nach Entfernung von 962 bp an gM-Sequenzen entsprechend verringert waren (auf 10.204 bp, 9.237 bp und 8.279 bp; Figur 3B).

Einzelstufen-Wachstums-Kinetiken von gM-negativen Viren (HΔgM-w oder HΔgM-GFP), die konstruiert worden waren, wie in der Legende zu Figur 1 gezeigt, und von RacH wurden durchgeführt. Rk13-Zellen in Platten mit 24 Vertiefungen wurden mit einem MOI-Wert von 2 an den entsprechenden Viren infiziert. Überstände und infizierte Zell-Pellets wurden getrennt zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. (0, 4, 8, 12, 16, 20, 24 h p.i.) geerntet. Überstände wurden von zellulären Bruchstücken durch Zentrifugation bei niedriger Geschwindigkeit geklärt, und die Zellen wurden einem Gefrieren-Auftauen unterzogen, bevor Zell-assoziierte Infektivität nachgewiesen wurde. Alle Virustiter wurden individuell auf Rk13- bzw. ccgM-Zellen in Platten mit 24

Vertiefungen bestimmt. Die Ergebnisse (Daten nicht gezeigt) können wie folgt zusammengefasst werden: Zell-assoziierte Infektivität beider HΔgM-Viren war um einen Faktor zwischen 1,6 (4 h p.i.) und 45 (20 h p.i.) auf Rk13-Zellen im Vergleich mit Titern von Zellen, die mit RacH infiziert waren, verringert (intrazelluläre Infektivität). Extrazelluläre Virustiter beider HΔgM-Viren waren maximal 186-fach (HΔgM-w) oder 650-fach (HΔgM-GFP) (12 h p.i.) im Vergleich mit denen von RacH verringert (extrazelluläre Infektivität), was auch auf eine Rolle von gM beim Virusaustritt von RacH hinweist.

### Beispiel 2: gM-deletierte EHV-4-Isolierungen

Um parallel zur Konstruktion von gM-negativem EHV-1 vorzugehen, wurde eine lacZ-Selektion zur Selektion von EHV-4 gewählt. Um die Isolierung eines gM-negativen EHV-4 zu ermöglichen, wurde eine Vero-Zelllinie, die konstitutiv EHV-4 gM exprimiert, konstruiert. Der Vero-Zellklon C1008 (ATCC Nummer CRL-1586) wurde in minimal essentiell Medium, angereichert mit 5-10% fetalem Kälberserum (Biochrom,  $\gamma$ -bestrahlt), gehalten. Die rekombinante Zelllinie Vero-gM wurde durch Effectene<sup>TM</sup> (Qiagen)-vermittelte Transfektion von 1  $\mu$ g Plasmid pCgM4 (Figur 3B) und 0,1  $\mu$ g Plasmid pSV2neo (das Resistenz gegenüber G418 verleiht; Neubauer et al., 1997) in Vero-Zellen erzeugt. Zellklone wurden zuerst auf Resistenz gegen G418 (Calbiochem) selektiert, dann auf trans-Komplementierung eines gM-negativen EHV-4. G418 wurde zu dem Medium jeder 5. Passage der rekombinanten Zelllinien gegeben (500  $\mu$ g/ml). Alle Zellen wurden regulär auf Mycoplasma durch PCR und auf virales Rinder-Diarrhoe-Virus (BVDV)-Antigen durch FACS-Analyse analysiert. Der ausgewählte Zellklon wurde als Vero-gM bezeichnet und in den nachstehenden Versuchen verwendet.

EHV-4-DNA wurde mit Plasmid pgM4 $\beta$ + (Figur 3B) in Vero-gM-Zellen cotransfiziert. Die Rekombination führte zu mehreren "lacZ-positiven" Plaques, die isoliert und erneut plattiert wurden. Dann zeigte sich jedoch, dass die Reinigung einer Deletionsmutante bei EHV-4 schwieriger und langsamer als bei EHV-1 war, und zwar weil: (i) "lacZ-positive" Plaques im Allgemeinen eine Anfärbung geringerer Intensität bei

Vero-Zellen als bei Rk13-Zellen zeigten und daher schwieriger zu identifizieren waren, und weil (ii) das EHV-4-System einer langsameren Replikation als EHV-1 unterlag und daher weniger Zeit zwischen Plaque-Identifizierung und Isolierung von lebensfähigen Virusnachkommen ließ.

Alle lacZ-positiven Plaques, die isoliert wurden, gingen in der ersten Runde der Reinigung verloren, was es erforderlich machte, nach einer anderen Lösung zu suchen. Es wurde daher versucht, den GFP-Marker auch für EHV-4 zu verwenden. In einer ersten Stufe wurde das Plasmid pgM4GFP+ (Figur 3B) konstruiert und für die Rekombination in EHV-4-DNA verwendet. Die resultierenden GFP-positiven Plaques wurden in drei Runden der Isolierung von Einzelplaques bei der Zelllinie Vero-gM gereinigt. Eine homogene GFP-positive Viruspopulation wurde gewählt, und virale DNA wurde einer Southern-Blot-Analyse unterzogen (Figur 4). DNA des resultierenden Virus E4ΔgM-GFP (Figur 3C) wurde dann mit dem Plasmid pgM4R oder pgM4w cotransfiziert (Figur 3B). Plasmid pgM4R wurde für die Konstruktion eines gM-reparierten EHV-4 verwendet, bezeichnet als E4RgM (Figur 3A). Plasmid pgM4w war die Basis zur Erzeugung des gleichzeitig gM- und Markergen-negativen EHV-4, E4ΔgM-w (Figur 3D). E4RgM und E4ΔgM-w-Viruspopulationen wurden auf einen GFP-negativen Phenotyp isoliert, auf Vero- oder Vero-gM-Zellen gereinigt und schließlich durch Southern-Blot analysiert (Figur 4). Zur Expression von EHV-4 gM in eukaryotischen Zellen wurde das Plasmid pCgM4 erzeugt (Figur 3B). Der vollständige ORF von EHV-4 gM wurde durch PCR unter Verwendung von Primern, die in Figur 8 angegeben sind, und der Taq-Polymerase (MBI-Fermentas) amplifiziert. Das resultierende PCR-Produkt wurde in den Vektor pcDNA1/Amp (Invitrogen) inseriert.

Das Plasmid pgM4R resultierte nach PCR-Amplifikation der Nucleotide 91.699 bis 94.808 (Telford et al., 1988) von EHV-4 und der Insertion des Amplifikationsprodukts in den Vektor pGEM3Zf+ (Promega) (Figur 3B; Figur 8). Dieses Plasmid wurde für die Konstruktion des gM-reparierten EHV-4, E4RGM, verwendet (Figur 3A).



Zur Konstruktion des Plasmids pgM4 $\beta$ + (Figur 3B), das entwickelt wurde, um zunächst 1110 bp der 1352 bp von EHV-4 gM zu deletieren, wurde eine mehrstufige Strategie gewählt. In der ersten Stufe wurden die beiden flankierenden Sequenzen, die für die DNA-Rekombination erforderlich waren, unabhängig durch PCR unter Verwendung der PFU-Polymerase (Stratagene) amplifiziert. Restriktionsstellen, die für die stufenweise Klonierung erforderlich waren, wurden durch Primersequenzen ergänzt (Figur 8). PCR-Produkte wurden in den Vektor pTZ18R (Pharmacia) inseriert, was zu den Plasmiden pgM4Del1 und pgM4Del2 (Figur 8) führte.

In einer nächsten Stufe wurde die 3,9 kbp umfassende E. coli lacZ-Expressionskassette aus dem Plasmid ptt264A+ (Osterrieder et al., 1996) durch Sall- und BamHI-Verdau freigesetzt und in das Plasmid pgM4Del1 inseriert, was zu dem Plasmid pgM4Del1 $\beta$ + führte. Anschließend wurden EHV-4-spezifische Sequenzen, entnommen aus pgM4Del2, in pgM4Del1 $\beta$ + unter Verwendung von PstI und Sall eingeführt, so dass die Markergen-Kassette durch EHV-4-spezifische Sequenzen in dem resultierenden Plasmid pgM4 $\beta$ + flankiert war (Figur 3B).

Das Plasmid pgM4 $\beta$ + wurde dann mit Sall und BamHI verdaut, wobei erneut die lacZ-Kassette freigesetzt wurde. Die resultierenden 5'-Überhänge wurden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, und das Konstrukt, das aus der erneuten Ligation resultierte, wurde als pgM4w bezeichnet (Fig. 3B). Erneut wurde eine Rahmenverschiebung zwischen den N-terminalen 208 nt und den restlichen C-terminalen 33 nt der gM-Sequenz ausgeführt.

Um das Plasmid pgM4GFP+ zu erzeugen (Fig. 3B), wurde die lacZ-Kassette aus pgM4 $\beta$ + (Figur 3B) unter Verwendung der Sall- und BamHI-Stellen entnommen und durch die GFP-Kassette (einschließlich CMV-Promotor und SV40-polyA) ersetzt, die aus dem Vektor pEGFP-C1 (Clontech) über AsnI- und MluI-Verdau entfernt worden war. Durch Restriktionsenzyme erzeugte Überhänge wurden stumpfendig eingestellt durch Klenow-Polymerase.

Die korrekte  
(MWG Biotech)

ion aller PCR-Produkte wurde durch Cyclo-Sequenzierung  
gleich mit der veröffentlichten Sequenz von E-M-1 Stamm

Die korrekte Amplifikation aller PCR-Produkte wurde durch Cyclo-Sequenzierung (MWG Biotech) und Vergleich mit der veröffentlichten Sequenz von EHV-4 Stamm NS80567 (Telford et al., 1998) bestätigt.

Die Rekombination in EHV-4 erfolgte unter Verwendung der Zelllinie Vero-gM, und das Plasmid pgM4 $\beta$ + oder pgM4GFP+ (Figur 3B) wurde mit EHV-4-DNA cotransfiziert, um ein gM-negatives EHV-4 der ersten Generation zu erzeugen (Figur 3C). Plasmid pgM4w (Figur 3B) in Kombination mit DNA des gM-negativen EHV-4 resultierte in E4 $\Delta$ gM-w (Figur 3D). Schließlich wurde das gM-reparierte EHV-4 E4RgM (Figur 3A) nach Cotransfektion von Plasmid pgM4R (Figur 3B) mit DNA von E4 $\Delta$ gM-GFP in Vero-Zellen isoliert.

DNA von EHV-4, E4RgM, E4 $\Delta$ gM-w und E4 $\Delta$ gM-GFP wurde mit PstI, EcoRV oder HindIII geschnitten, und DNA-Fragmente wurden auf Nylon-Membranen übertragen. Parallele Membranen wurden entweder mit GFP-spezifischen Sequenzen (identisch zu Figur 2) oder mit einer Sonde, bezeichnet als gM3.1, die die EHV-4-spezifischen Sequenzen, die dem Plasmid pgM4R entnommen waren, enthielt, hybridisiert (Figur 3B).

Die beobachteten Ergebnisse des Verdaus (Figur 4) waren wie folgt:

- (i) Bei DNA von E4 $\Delta$ gM-GFP erkannte die GFP-Sonde Fragmente bei 5.531 bp, wenn mit PstI geschnitten wurde, bei 8.383 bp nach EcoRV-Verdau und bei 4.528 bp nach HindIII-Verdau. Identische Fragmente plus Fragmente bei 1.792 bp (PstI), 1.801 bp (EcoRV) und 826 plus 5.487 bp (HindIII) reagierten mit der Sonde gM3.1.
- (ii) Weder Eltern-EHV-4 noch repariertes Virus E4RgM oder E4 $\Delta$ gM-w trugen irgendwelche GFP-spezifischen Sequenzen.
- (iii) Die gM3.1-reaktiven DNA-Fragmente in EHV-4 und E4RgM wurden bei 6.806 bp (PstI), bei 7.874 bp plus 1.801 bp (EcoRV) und bei 4.837 plus 5.487 bp (HindIII) nachgewiesen.
- (iv) Das gM- und GFP-Kassette-negative Virus E4 $\Delta$ gM-w hybridisierte nicht mit GFP-Sequenzen, jedoch mit den entsprechenden EHV-4-spezifischen Sequenzen (gM3.1). Die letztgenannte Sonde wies Fragmente nach, denen 1110 bp an gM-

Sequenzen im Vergleich mit Wildtypvirus fehlten, d.h. bei 5.696 bp (PstI), bei 6.764 bp plus 1.801 bp (EcoRV) bzw. bei 3.727 bp plus 5.487 bp (HindIII).

Bei HindIII-geschnittener DNA aller dieser Viren existiert ein weiteres gM3.1-Sonde-spezifisches Fragment bei 126 bp (Fig. 2C); dieses Fragment ist jedoch zu klein, um bei diesem Southern-Blot gezeigt zu werden.

Die Viren E4HΔgM-GFP und E4HΔgM-w verloren ihr Vermögen zur Expression von gM, und E4HΔgM-w verlor außerdem die Markergen-Sequenz.

a) Viruswachstum auf Kulturzellen. Viruswachstumseigenschaften der verschiedenen mutierten Viren, wie sie vorstehend ausführlich angegeben wurden, wurden auf Vero- und auf Vero-gM-Zellen verglichen. Zellen, die in Platten mit 24 Vertiefungen überimpft waren, wurden bei einem MOI-Wert von 1-2 infiziert, und extrazelluläre (extrazelluläre Infektivität) und intrazelluläre (intrazelluläre Infektivität) Virustiter wurden zu verschiedenen Zeitpunkten p.i. bestimmt (Fig. 5). Während die Wachstumseigenschaften des wiederhergestellten E4RgM-Virus denen von EHV-4 gut entsprachen, gab es eine überraschende Hemmung der Bildung von extrazellulären Virustitern bei E4ΔgM-w und E4ΔgM-GFP auf nicht komplementierenden Zellen. Innerhalb dieser Reihe von Experimenten (Mittelwert von zwei unabhängigen Experimenten) konnte extrazelluläre Infektivität niemals vor 24 h p.i. nachgewiesen werden. Selbst bei 30 h p.i. wurden extrazellulär nur sehr niedrige Titer beobachtet (maximal 1,5 Plaques/ ml bei der geringsten Verdünnung  $10^{-1}$ ), obwohl Zellen eine schwere cytopathische Wirkung zeigen. Unterschiede in der intrazellulären Infektivität erreichen jedoch niemals den Faktor 100 und erreichten einen maximalen Wert bei 24 h p.i. (84-fach zwischen EHV-4 und E4ΔgM-w). Die Verzögerung im Nachweis der intrazellulären Infektivität gab es nur bei einem Zeitpunkt (12 h gegenüber 15 h p.i.). Zusammengefasst konnte überraschenderweise gezeigt werden, dass die Deletion von gM-Sequenzen des EHV-4-Hintergrunds massiv die Virus-Replikation in vitro beeinflusste, dass jedoch die Expression von gM für die Replikation nicht essentiell ist. Insbesondere extrazellulär infektiöses Virus nahm ab,

und die Fähigkeit zur direkten Infektion benachbarter Zellen wurde verringert, was durch die Plaque-Größen widerspiegelt wird.

b) Plaque-Größe. Durchmesser von 150 Plaques nach Infektion von Vero- oder Vero-gM-Zellen mit EHV-4, E4RgM, E4ΔgM-w oder E4ΔgM-GFP wurden gemessen, und mittlere Plaque-Größen wurden relativ zu den Größen von Wildtyp-Plaques, die auf 100% festgelegt wurde, bestimmt. Es wurde klar gezeigt, dass die gM-negativen Viren in der Lage waren, Vero-Zellen zu infizieren und dort repliziert zu werden, wobei jedoch der maximale Plaque-Durchmesser merklich verringert war, und zwar auf weniger als 20% der Wildtyp-Plaque-Durchmesser (Figur 6). Die Infektion mit Eltern- oder wiederhergestelltem Virus führte zu einem Wildtyp-artigen Erscheinungsbild der Plaques, was zeigt, dass der beobachtete Phenotyp in der Tat durch die gM-Deletion induziert war. Dies wurde weiter bestätigt durch die Tatsache, dass die Plaque-Bildung von E4ΔgM-w und E4ΔgM-GFP bei der Zelllinie Vero-gM vollständig wiederhergestellt war (Daten nicht gezeigt).

c) Penetrationsexperimente. Bei diesem Experiment wurde der Einfluss von EHV-4-gM auf die Eintrittskinetik von EHV-4 bewertet. 100 PFU der verschiedenen Viren: Ausgangs-EHV-4, gM-repariertes Virus E4RgM sowie gM-Deletionsmutanten und E4ΔgM-GFP (vgl. Figur 3) ließ man an Vero-Zellen in Platten mit 6 Vertiefungen bei 4°C adsorbieren. Nach 90 min wurden die entsprechenden Überimpfungen durch frisches Medium ersetzt, und die Penetration wurde durch Verschiebung der Inkubationstemperatur auf 37°C eingeleitet. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Temperaturverschiebung - beginnend unmittelbar (= 0 min) - wurde die extrazelluläre Infektivität durch Behandlung der Zellen mit Citratpuffer (pH-Wert 3,0) pH-inaktiviert. Parallele Proben wurden entsprechend gewaschen, wobei der Citratpuffer jedoch durch PBS ersetzt wurde, so dass zu jedem Zeitpunkt die "adsorbierte Infektivität" mit der "penetrierten Infektivität" verglichen werden konnte. Die Zahlen der Plaques wurden durch Inkubation von Zellen für 4 Tage unter einer Methocel-Überschichtung bestimmt.

c) Mehrere Sätze von Experimenten wurden durchgeführt: In Figur 7A sind Ergebnisse für genotypisch und phenotypisch gM-negative Viren nach Vermehrung in nicht komplementierenden Vero-Zellen gezeigt, während Figur 7B die Kinetiken von phenotypisch komplementierten E4ΔgM-w und E4ΔgM-GFP zeigt, wobei die Viren auf gM-exprimierenden Vero-gM-Zellen gezüchtet worden waren.

Ein Mittelwert von 52,8% (56,7%) des infektiösen Ausgangs-EHV-4 (E4RgM) war vor extrazellulärer Säurebehandlung 40 min nach Einleiten der Penetration (Fig. 7A, offene Kreise) geschützt, während nur 33,7% (E4ΔgM-w - ausgefüllte Rechtecke) und 38,5% (E4ΔgM-GFP, ausgefüllte Dreiecke) der gM-negativen Viren geschützt waren. Zu späteren Zeitpunkten der Eintrittskinetik beginnen die Graphen, in verschiedenartiger Weise zu überlappen, und ein maximaler Penetrationswirkungsgrad zwischen 61,7% und 78,9% wird nach 150 min Penetrationszeit erreicht, was anzeigt, dass eine bestimmte Variabilität des Assays für die beobachteten geringfügigen Unterschiede verantwortlich sein mag.

(Fig. 7A). Wenn gM-negative Viren auf komplementierenden Vero-gM-Zellen hergestellt worden waren, wurde keinerlei Unterschied in ihrem Penetrationswirkungsgrad beobachtet (7B). Im Gegensatz zur Verzögerung bei der Eintrittskinetik von gM-negativem EHV-1 von etwa 20% (Stamm RacL11; Osterrieder et al., 1996) bis zu 40% (Stamm KyA; Seyboldt et al., 2000) muss die Wirkung der Deletion von gM auf EHV-4 mit Vorsicht gesehen werden. Dennoch können die folgenden Schlussfolgerungen gezogen werden: (i) Ein Unterschied wurde in den Kinetiken von phenotypisch komplementierten gegenüber nicht komplementierten gM-negativen Viren beobachtet (Fig. 7A-B), (ii) der Einfluss der Deletion von gM auf die EHV-4-Penetration ist jedoch praktisch vernachlässigbar.

### **Beispiel 3: Analyse von Pferdeseren auf Anti-gM-Antikörper unter Verwendung eines gM-spezifischen serologischen Tests**

Um festzustellen, ob gM als ein serologischer Marker zur Unterscheidung einer Wildtyp-Infektion von der Impfung mit einem gM-negativen Vaccin verwendet werden kann, mussten mehrere Annahmen getestet werden. Zunächst musste bewertet

werden, ob Seren von mit Feldvirus infizierten Pferden gM-spezifische Antikörper enthalten. Für die anfängliche Analyse wurde ein Western-Blot-Test gewählt, da dieses System es erlaubte, eine spezifische Reaktion gegenüber einer Hintergrundreaktivität zu identifizieren. Bei Verwendung von hochgradig neutralisierenden Seren (EHV-1 und/oder -4 neutralisierende Titer zwischen 1:128 und 256) wurde festgestellt (Daten nicht gezeigt), dass Lysate der EHV-1 gM exprimierenden Zelllinie ccgM den Nachweis eines spezifischen Signals durch Pferdeseren ermöglichte und dass eine Verdünnung von Seren auf 1:3.000 am besten zu funktionieren schien.

Dementsprechend wurden die Seren aller 12 Fohlen (6 geimpfte und 6 Kontrollen), die an dem EHV-1-gM-Vaccin-Versuch teilgenommen hatten, auf gM-Reaktivität in einem Western-Blot analysiert. Von jedem einzelnen Pferd wurden drei verschiedene Seren getestet: entnommen vor Eintritt in den Versuch (Pre), 4 Wochen nach der zweiten Impfung (V2) und zwei Wochen nach der Belastungsinfektion (C).

Zusammengefasst wurde durch Western-Blot-Analysen (Fig. 9) gezeigt, dass (i) Seren von Pferden, die EHV-1-Neutralisationsaktivität zeigten, alle positive Testergebnisse für gM ergaben, dass (ii) gM-Reaktivität niemals in einer Probe nachgewiesen wurden, die vor einem bekannten Kontakt mit EHV-1 oder nach Impfung mit gM-negativem EHV-1 analysiert wurde und dass (iii) nach Infektion von Vaccin-Testpferden mit dem gM-positiven Belastungsvirus, gM klar in 10 von 12 Fällen nachweisbar war. Schließlich (iv) wurde beobachtet, dass anti-EHV-1-Antikörper-Titer und die Intensität der gM-Reaktivität nicht direkt korreliert zu sein schienen.

Aufgrund der hohen Hintergrund-Reaktivität von Pferdeseren ist die Etablierung serologischer Tests schwierig. Auf der Basis indirekter Immunfluoreszenz (IIF)-Daten, die bei Pferdeseren erhalten wurde, wurde bestätigt, dass ein indirektes oder ein Blockierungstestsystem etabliert werden muss oder hochgereinigte gM-Polypeptide in einem ELISA-Test verwendet werden müssen. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA wie folgt etabliert. Gereinigte gM-Polypeptide oder vollständiges gM wurden auf einem festen Träger einer Platte mit 96 Vertiefungen immobilisiert, die

beschichtet wurde, um eine gute Haftung des einfangenden Proteins sicherzustellen. Für den Assay wurden unspezifische Bindungsstellen mit Milchpulver oder ähnlichen Substanzen blockiert, um eine unspezifische Bindung zu verhindern. Anschließend wurde die Kunststoffoberfläche mit einem geeigneten Waschpuffer (z.B. PBS-Tween) gewaschen, um überschüssiges blockierendes Mittel zu entfernen. Anschließend wurden die Testproben zu ausgewählten Vertiefungen gegeben, und die ELISA-Platte wurde bei 37°C nach standardisierten Verfahren inkubiert, was die Bindung von Antikörpern in der Testprobe an das immobilisierende einfangende Protein ermöglichte. In der nächsten Stufe wurden die Vertiefungen der ELISA-Platte gründlich mehrere Male unter Spülen mit Waschpuffer gewaschen, gefolgt von der Zugabe eines geeigneten Pferde-Antikörpers, gekoppelt an ein Enzym, wie HRP (Meerrettich-Peroxidase). Der Nachweis von gebundenem Antikörper/HRP-Konjugat erfolgte schließlich durch Zugabe eines geeigneten Substrats, gefolgt von photometrischem Ablesen der optischen Dichte der einzelnen Vertiefungen. Der erhaltene Wert war mit positiven und negativen Kontrollansätzen im gleichen Assay zu vergleichen.

### Literatur

**Allen, G.P., Yeargan, M., Costa, L.R.R. und Cross, R., 1995.** Major histocompatibility complex class I-restricted cytotoxic T-lymphocyte responses in horses infected with equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **69**, 606-612.

**Allen, G.P. und Yeargan, M.R., 1987.** Use of  $\lambda$ gt11 and monoclonal antibodies to map the genes for the six major Glykoproteins of equine herpesvirus 1. *J. Virol.* **61**, 2454-2461.

**Awan, A.R., Chong, Y.-C. und Field, H.J., 1990.** The pathogenesis of equine herpesvirus type 1 in the mouse: A new model for studying host responses to the infection. *J. Gen. Virol.* **71**, 1131-1140.



**Baines, J.D. und Roizman, B.,** 1991. The open reading frames UL3, UL4, UL10 and UL16 are dispensable for the replication of herpes simplex virus 1 in cell culture. *J. Virol.* **65**, 938-944.

**Baines, J.D. und Roizman, B.,** 1993. The UL10 gene of herpes simplex virus 1 encodes a novel viral Glykoprotein, gM, which is present in the virion and in the plasma membrane of infected cells. *J. Virol.* **67**, 1441-1452.

**Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C.,** 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* **263**, 802-805.

**Flowers, C.C. und O'Callaghan, D.J.,** 1992. The equine herpesvirus type 1 (EHV-1) homolog of herpes simplex virus type 1 US9 and the nature of a major deletion within the unique short segment of the EHV-1 KyA strain genome. *Virology* **190**, 307-315.

**Hübert, P.H., Birkenmaier, S., Rziha, H.J. und Osterrieder, N.,** 1996. Alterations in the equine herpesvirus type-1 (EHV-1) strain Rach during attenuation. *J. Vet. Med. B* **43**, 1-14.

**Kyhse-Andersen, J.,** 1984. Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods* **10**, 203-210.

**Laemmli, U.K.,** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

**MacLean, C.A., Robertson, L.M. und Jamieson, F.E.,** 1993. Characterization of the UL10 gene product of herpes simplex virus type 1 and investigation of its role in vivo. *J. Gen. Virol.* **74**, 975-983.

**Malik, A.K., Martinez, R., Muncy, L., Carmichael, E.P. und Weiler, S.K., 1992.** Genetic analysis of the herpes simplex virus type 1 UL9 gene: isolation of a LacZ insertion mutant and expression in eukaryotic cells. *Virology* **190**(2), 702-715.

**Mayr, A., Pette, J., Petzoldt, K. und Wagener, K., 1968.** Untersuchungen zur Entwicklung eines Lebendimpfstoffes gegen die Rhinopneumonitis (Stutenabort) der Pferde. *J. Vet. Med. B* **15**, 406-418.

**Neubauer, A., Beer, M., Brandmüller, C., Kaaden, O.-R. und Osterrieder, N., 1997.** Equine herpesvirus 1 mutants devoid of Glykoprotein B or M are apathogenic for mice but induce protection against challenge infection. *Virology* **239**, 36-45.

**Osterrieder, N., Neubauer, A., Brandmüller, C., Braun, B., Kaaden, O.-R. und Baines, J.D., 1996.** The equine herpesvirus 1 Glykoprotein gp21/22a, the herpes simplex virus type 1 gM homolog, is involved in virus penetration and cell-to-cell spread of virions. *Journal of Virology*, Juni 1996, S. 4110-4115.

**Osterrieder, N., Wagner, R., Brandmüller, C., Schmidt, P., Wolf, H. und Kaaden, O.-R., 1995.** Protection against EHV-1 challenge infection. in the murine model after vaccination with various formulations of recombinant Glykoprotein gp14 (gB) *Virology* **208**, 500-510.

**Pilling, A., Davison, A.J., Telford, E.A.R. und Meredith, D.M., 1994.** The equine herpesvirus type 1 Glykoprotein homologous to herpes simplex virus type 1 Glykoprotein M is a major constituent of the virus particle. *J. Gen. Virol.* **75**, 439-442.

**Sambrook, J., Fritsch, D.F. und Maniatis, T., 1989.** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

**Seyboldt, C., 2000.** Structural and functional analysis of the equine herpesvirus type 1 Glykoprotein M. Doktorarbeit, Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland.

**Stokes, A., Alber, D.G., Greensill, J., Amellal, B., Carvalho, R., Taylor, L.A., Doel, T.R., Killington, R.A., Halliburton, I.W. und Meredith, D.M., 1996.** The expression of the proteins of equine herpesvirus 1 which share homology with herpes simplex virus 1 Glykoproteins H and L. *Virus Res.* **40**, 91-107.

**Telford, E.A.R., Watson, M.S., McBride, K. und Davison, A.J., 1992.** The DNA sequence of equine herpesvirus-1. *Virology* **189**, 304-316.

**Telford, E.A.R., Watson, M.S., Perry, J., Cullinane, A.A. und Davison, A.J., 1998.** The DNA sequence of equine herpesvirus-4. *Journal of Gen. Virol.* **79**, 1197-1203.

**Tewari, D., Whalley, J.M., Love, D.N. und Field, H.J., 1994.** Characterisation of immune responses to baculovirus expressed equine herpesvirus type 1 Glykoproteins D and H in a murine model. *J. Gen. Virol.* **75**, 1735-1741.

## PATENTANSPRÜCHE

1. Pferde-Herpesvirus (EHV), worin das Protein gM abwesend ist, dadurch gekennzeichnet, dass das EHV frei von heterologen Elementen ist.
2. EHV nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen, das für das Protein gM kodiert, deletiert ist.
3. EHV nach Anspruch 1 oder 2, erhältlich nach einem Verfahren, das folgende Stufen umfasst:
  - a) Isolierung eines Wildtyp-EHV;
  - b) Etablierung eines Plasmids, das das EHV-gM-Gen kodiert, gegebenenfalls mit flankierenden Sequenzen;
  - c) Erzeugung einer komplementierenden Zelllinie, die gM oder Teile davon exprimiert;
  - d) Etablierung eines EH-Virus, das ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert in seiner gM kodierenden Sequenz trägt, durch Cotransfektion der komplementierenden Zelllinie von Stufe b) mit EHV-Nucleinsäure und einem Plasmid, das gM kodiert, das durch ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert unterbrochen ist;
  - e) Deletion der GFP-kodierenden Kasette; und
  - f) Selektion auf die EHV-Klone, worin die GFP-kodierende Kasette erfolgreich deletiert ist.
4. EHV nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um EHV-1 handelt.
5. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass 850 bis 1100 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind.
6. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte gM kodierende Sequenz deletiert ist, mit Ausnahme von 150 bis 200

bp der kodierenden Sequenz für den C-terminalen Abschnitt und mit Ausnahme von 150 bis 250 bp der kodierenden Sequenz für den N-terminalen Abschnitt.

7. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 93268-93318 bis 94222-94322 der gM kodierenden Sequenz, wie sie den Telford-Positionen (1992) entsprechen, deletiert sind.
8. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 93268 bis 94322 der gM kodierenden Sequenz, wie sie den Telford-Positionen (1992) entsprechen, deletiert sind.
9. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte gM kodierende Sequenz mit Ausnahme von 184 bp der kodierenden Sequenz für den C-terminalen Abschnitt und mit Ausnahme von 209 bp der kodierenden Sequenz für den N-terminalen Abschnitt deletiert ist.
10. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 94263 bis 93302 der gM kodierenden Sequenz, wie sie den Telford-Positionen (1992) entsprechen, deletiert sind.
11. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine rekombinante Variante auf der Basis des Stamms RacH von EHV-1 handelt.
12. EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um die RacH-basierte rekombinante Variante Isolierung HΔ-gM-w handelt, die bei der ECACC am 16.10.02 unter der Hinterlegungsnummer 02101663 hinterlegt wurde.
13. EHV nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um EHV-4 handelt.

14. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass 900 bis 1150 bp des offenen Leserahmens für gM deletiert sind.
15. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte gM kodierende Sequenz deletiert ist, mit Ausnahme von 0 bis 50 bp der kodierenden Sequenz für den C-terminalen Abschnitt und mit Ausnahme von 150 bis 250 bp der kodierenden Sequenz für den N-terminalen Abschnitt.
16. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 92681-92731 bis 93765-93865 der gM kodierenden Sequenz, wie sie den Telford-Positionen (1998) entsprechen, deletiert sind.
17. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 13 bis 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 92681 bis 93865 der gM kodierenden Sequenz, wie sie den Telford-Positionen (1998) entsprechen, deletiert sind.
18. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte gM kodierende Sequenz mit Ausnahme von 34 bp der kodierenden Sequenz für den C-terminalen Abschnitt und mit Ausnahme von 209 bp der kodierenden Sequenz für den N-terminalen Abschnitt deletiert ist.
19. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleotide 92715 bis 93824 der gM kodierenden Sequenz, wie sie den Telford-Positionen (1998) entsprechen, deletiert sind.
20. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine rekombinante Variante auf der Basis vom MSV Charge 071398 von EHV-4 handelt.

21. EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass es auf MSV Charge 071398 und Isolierung E4ΔgM-w basiert und dass es das EHV-4, das bei der ECACC am 16.10.02 unter der Hinterlegungsnummer 02101663 hinterlegt wurde, ist.
22. Nucleinsäure, kodierend für ein EHV nach einem der Ansprüche 1 bis 21.
23. Vaccin-Präparat, umfassend ein EHV nach einem der Ansprüche 1 bis 21.
24. Vaccin-Präparat, umfassend eine Nucleinsäure nach Anspruch 22.
25. Verwendung von EHV nach einem der Ansprüche 1 bis 21 bei der Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe und/oder Behandlung von EHV-assoziierten Zuständen.
26. Verwendung einer Nucleinsäure nach Anspruch 22 bei der Herstellung eines Medikaments für die Prophylaxe und/oder Behandlung von EHV-assoziierten Zuständen.
27. Verfahren für die Prophylaxe und/oder Behandlung eines Tiers, dadurch gekennzeichnet, dass ein Vaccin-Präparat nach einem der Ansprüche 23 oder 24 dem Tier verabreicht und der therapeutische Erfolg überwacht wird.
28. Vaccin-Präparat, umfassend mindestens ein EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und ein EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 21.
29. Verwendung mindestens eines EHV-1 nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und eines EHV-4 nach einem der Ansprüche 1 bis 3 oder 13 bis 21 bei der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von EHV-assoziierten Zuständen.

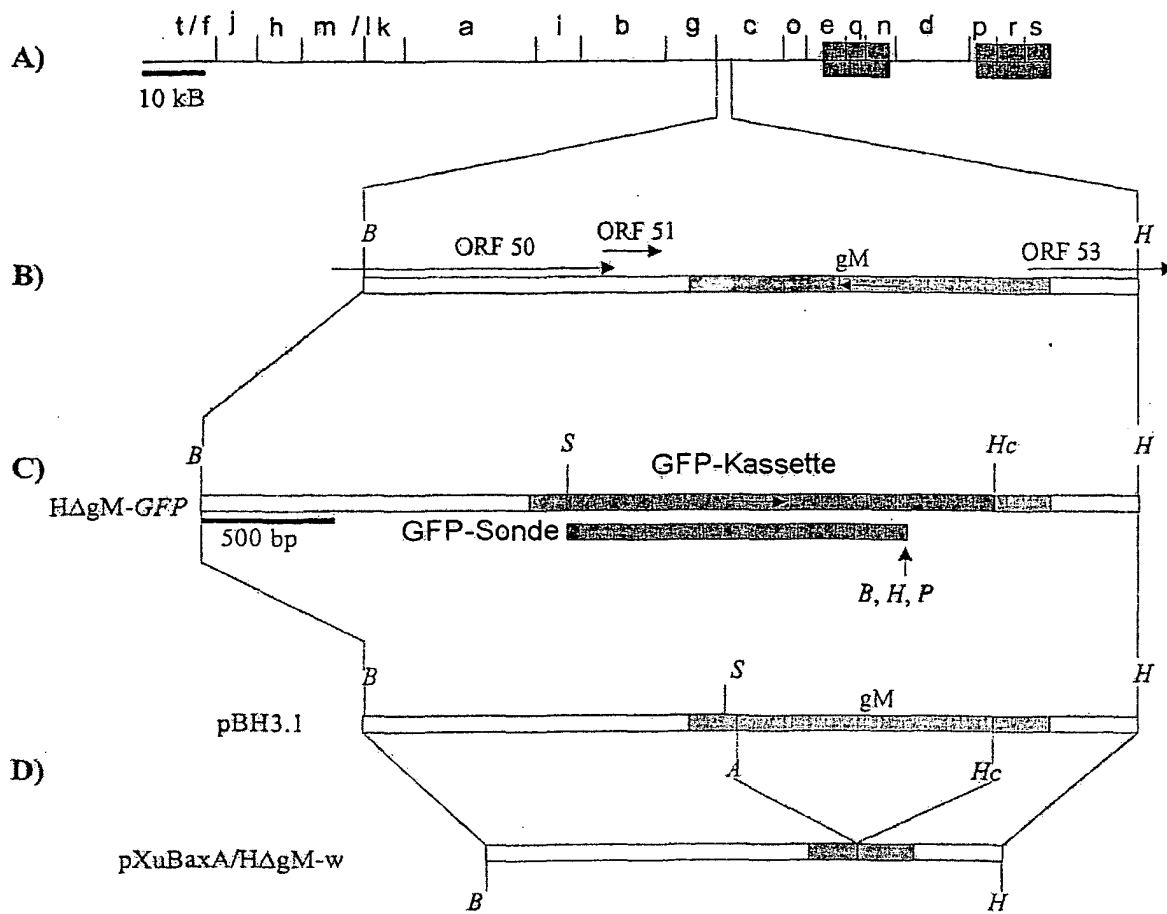
30. Verfahren zur Prophylaxe und/oder Behandlung eines Tiers, dadurch gekennzeichnet, dass ein Vaccin-Präparat nach Anspruch 28 dem Tier verabreicht und der therapeutische Erfolg überwacht wird.
31. Verfahren, um ein rekombinantes EHV zu erhalten, das folgende Stufen umfasst:
- a) Isolierung eines Wildtyp-EHV;
  - b) Etablierung eines Plasmids, das für das EHV-gM-Gen kodiert, gegebenenfalls mit flankierenden Sequenzen;
  - c) Erzeugung einer komplementierenden Zelllinie, die gM oder Teile davon exprimiert;
  - d) Etablierung eines EH-Virus, das ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert in seiner gM kodierenden Sequenz trägt, durch Cotransfektion der komplementierenden Zelllinie von Stufe b) mit EHV-Nucleinsäure und einem Plasmid, das gM kodiert, das durch ein GFP-kodierendes Kassetten-Insert unterbrochen ist;
  - e) Deletion der GFP-kodierenden Kasette; und
  - f) Selektion auf die EHV-Klone, worin die GFP-kodierende Kasette erfolgreich deletiert ist.
32. Zelllinie für die Verwendung bei einem Verfahren nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, dass das Gen, das das Protein gM kodiert, in die Zelllinie transfiziert ist und dass die Zelllinie gM exprimiert.
33. Zelllinie nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um eine Zelllinie handelt, die aus der Gruppe Vero-Zellen, RK-13 und cc ausgewählt ist.
34. Zelllinie nach einem der Ansprüche 31 bis 33, dadurch gekennzeichnet, dass es die gM-komplementierende Zelllinie VERO GM ist, die bei der ECACC am 28.01.03 unter der Hinterlegungsnummer 03012801 hinterlegt wurde.



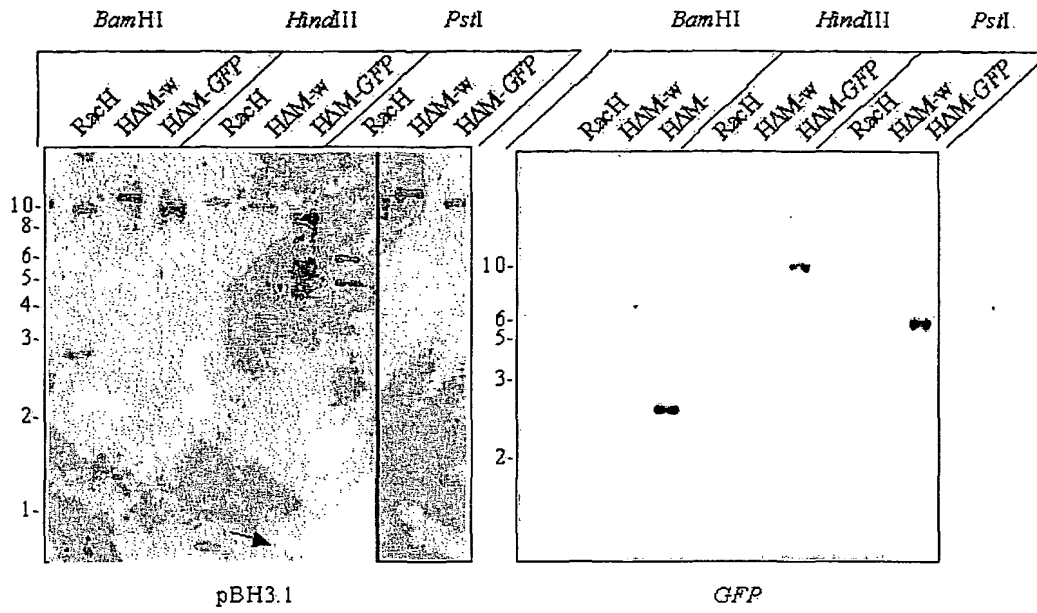
## **ZUSAMMENFASSUNG**

Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Tiergesundheit und insbesondere Pferde-Herpesviren (EHV), wobei das Gen, das das Protein gM kodiert, abwesend ist, und die frei von heterologen Elementen sind. Weitere Aspekte der Erfindung betreffen pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Viren umfassen, deren Verwendung und Verfahren zur Prophylaxe und Behandlung von EHV-Infektionen. Die Erfindung betrifft auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die die Kombination von EHV-1- und EHV-4-Viren umfassen, wobei das Gen, das das Protein gM kodiert, abwesend ist, und die frei von heterologen Elementen sind.

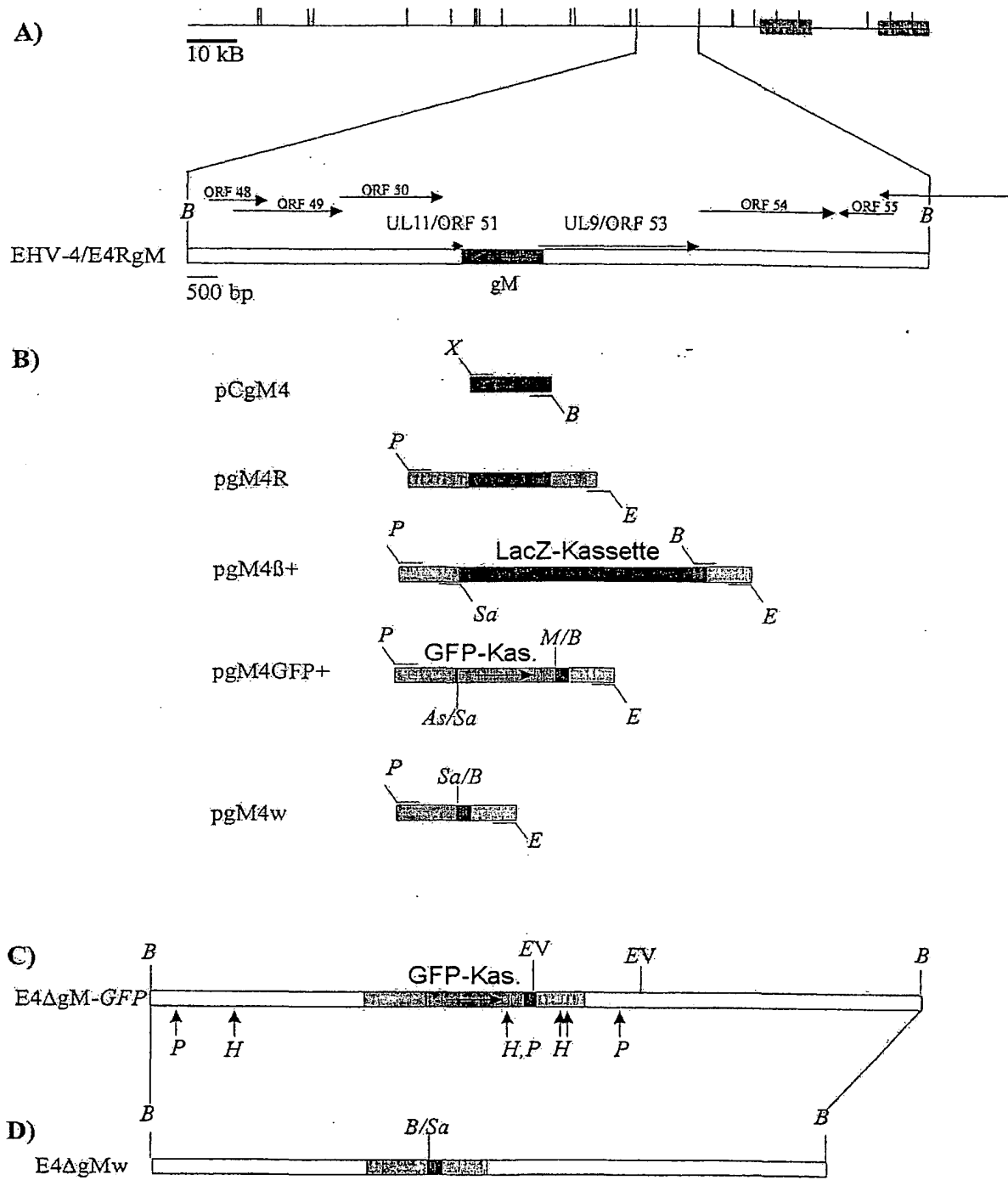
Figur 1:



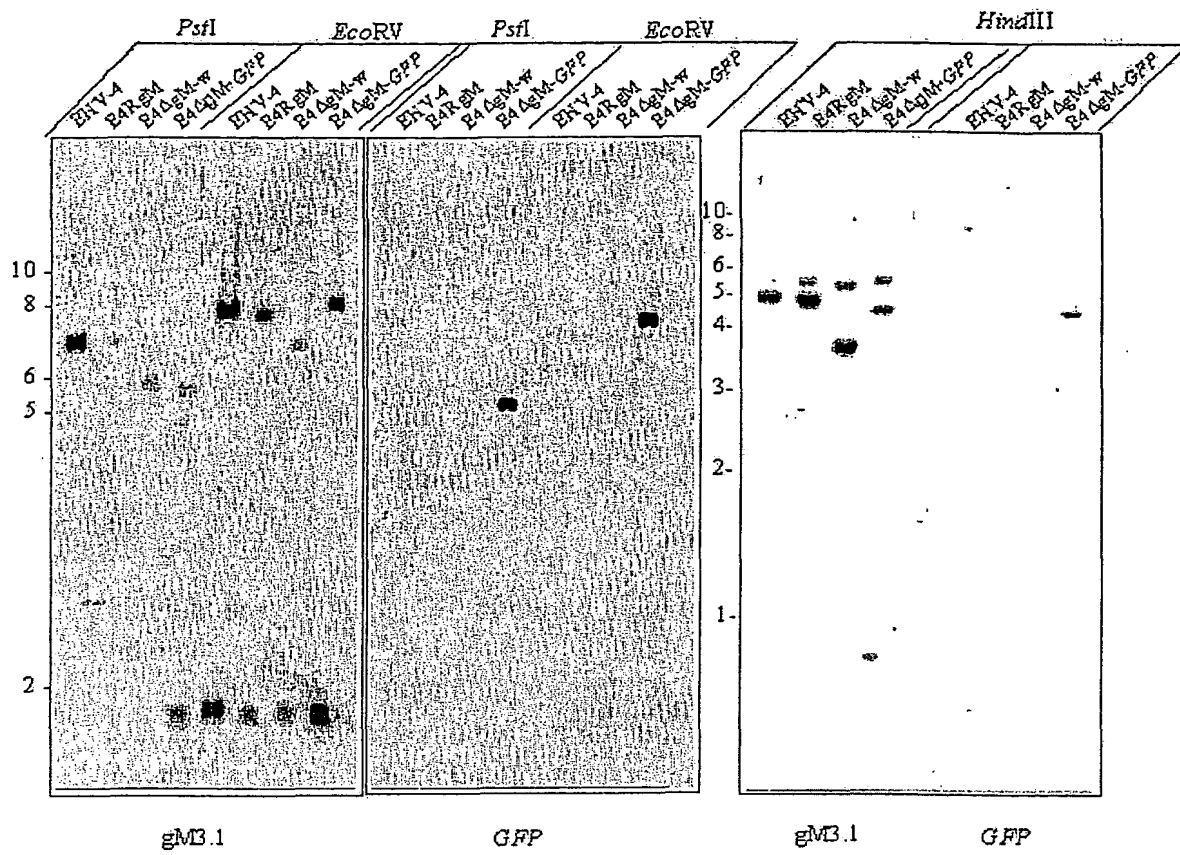
Figur 2:



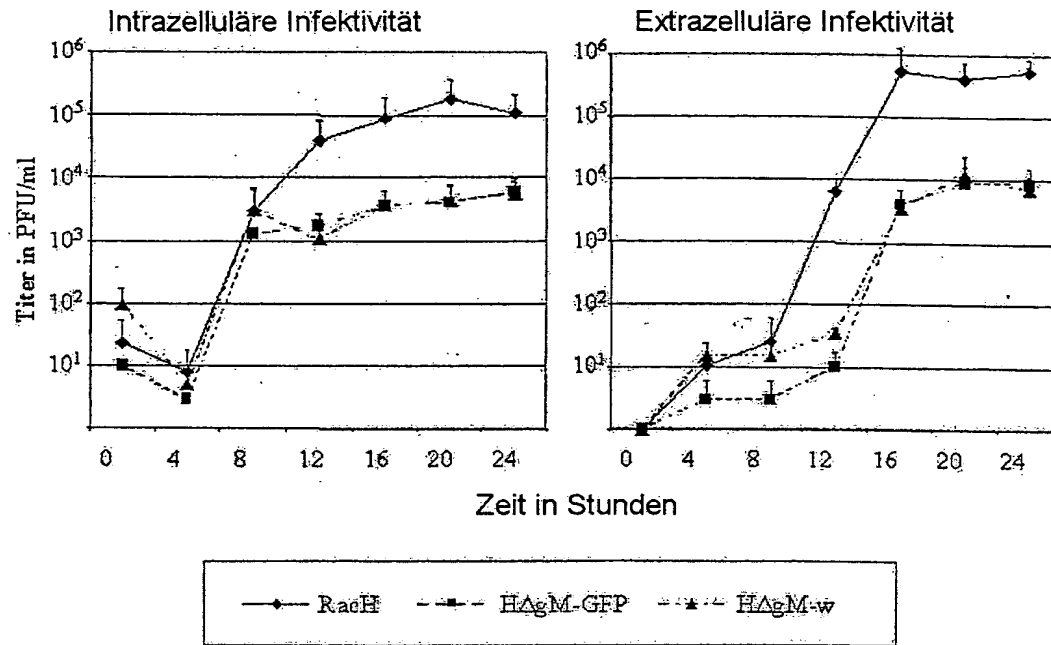
Figur 3:



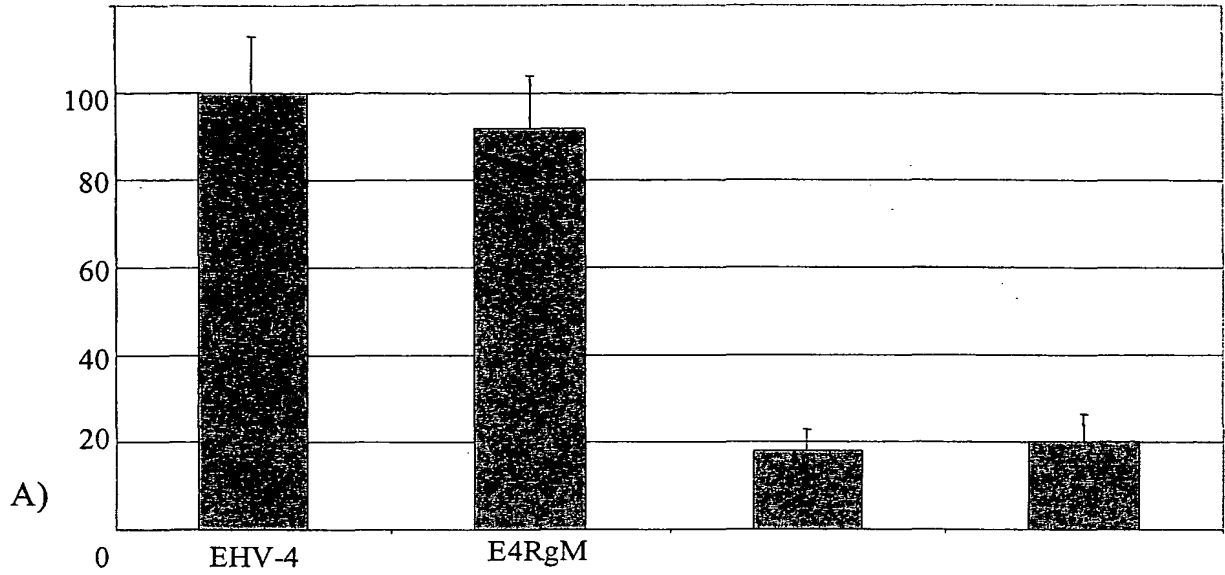
Figur 4:



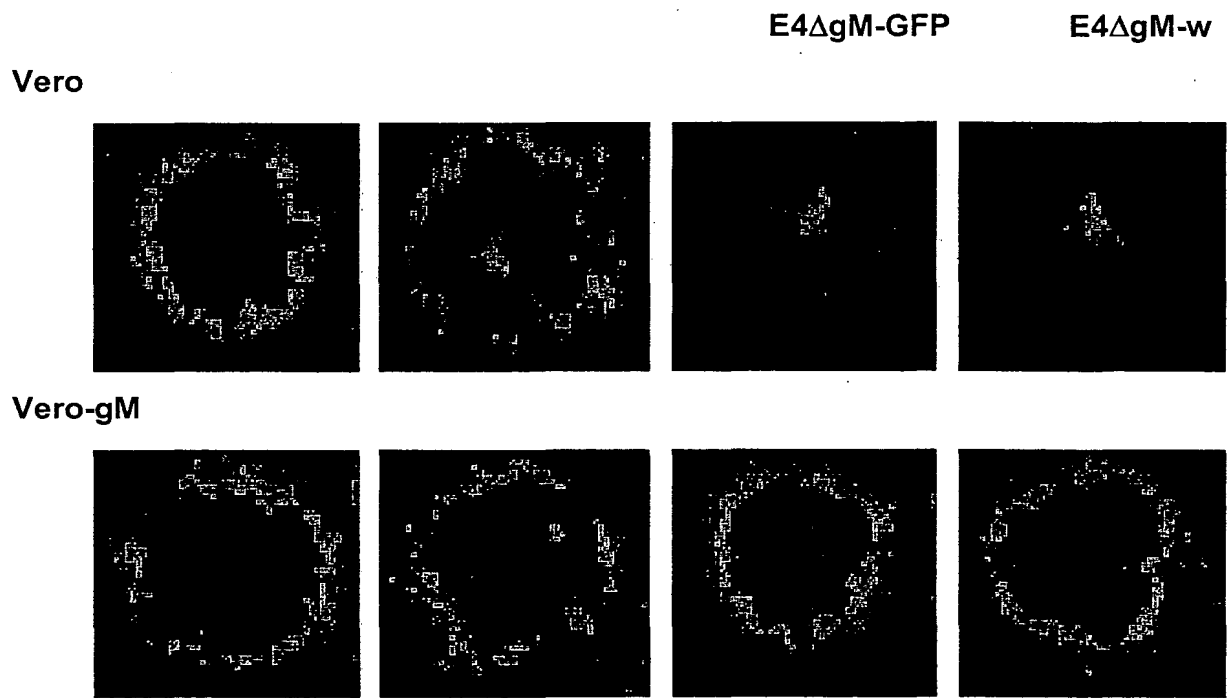
Figur 5:



Figur 6:

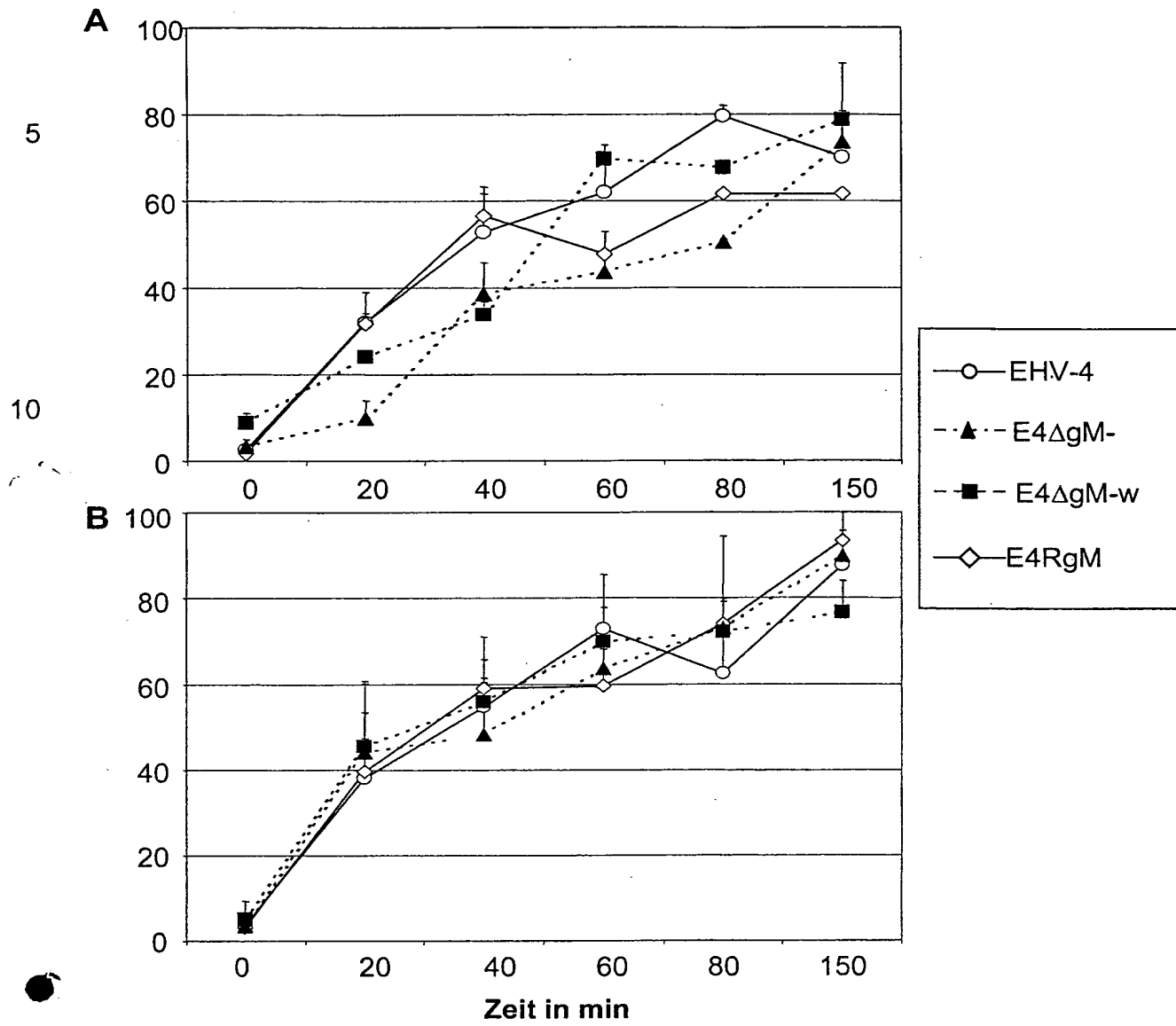


5



10

Figur 7:

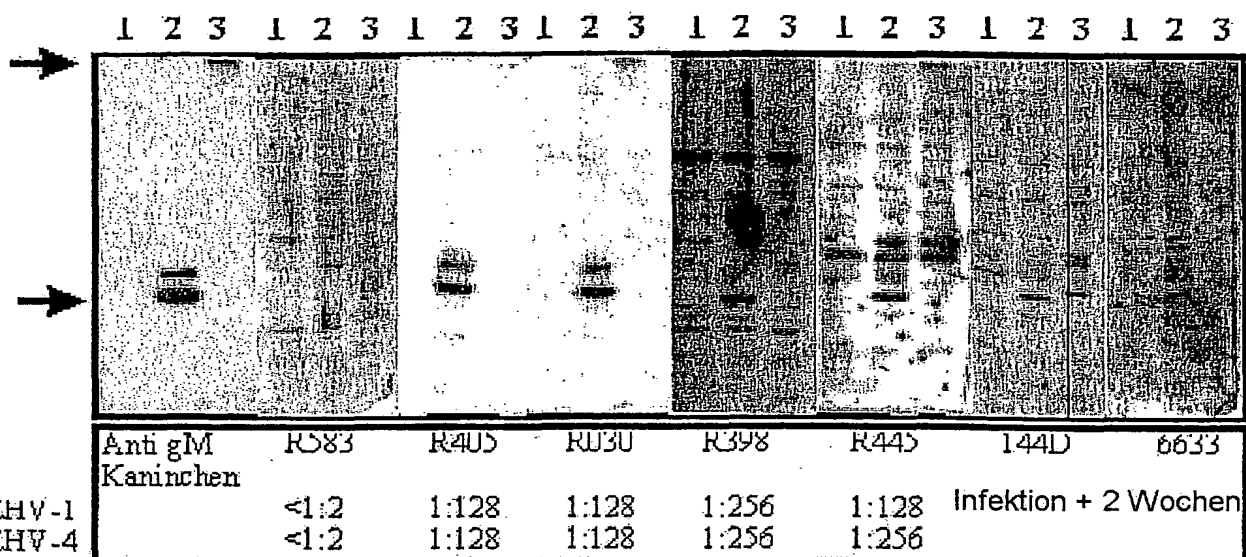




Figur 8:

Resultierendes Plasmid:	5'-Primer	3'-Primer	Länge des Produkts (Anordnung)
<b>pCgM4</b> Vektor : pCDNAI/Amp	5'gcctctagattaacggtaa tctctgcgc3'; <b>XbaI</b>	5'aaggatccatggcagcagc tggcg3'; <b>BamHI</b>	1352 bp (nt 92681-94033)
<b>pgM4R</b> Vektor: pGEM3Zf+	5'aatctgcaggtacgtacgg cctatg 3'; <b>PstI</b>	5'aagaattccgcaatacgtc cgtcc3'; <b>EcoRI</b>	3113 bp (nt 91699-94808)
<b>pgM4Del1</b> Vektor: pTZ18R	5'ccggatccctaccagaga cccataa3'; <b>BamHI</b>	5'aagaattccgcaatacgtc cgtcc3'; <b>EcoRI</b>	983 bp (nt 93825-94808)
<b>pgM4Del2</b> Vektor: pTZ18R	5'aatctgcaggtacgtacgg cctatg 3'; <b>PstI</b>	5'ttaagtcgacatttgaataga aactcg 3'; <b>SalI</b>	1017 bp (nt 91699-92714)

Figur 9:



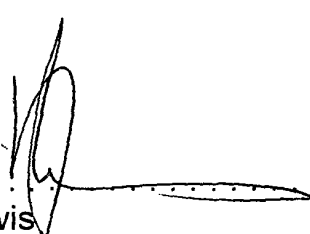
THE COMPLETE CELL SOLUTION



# Centre for Applied Microbiology and Research and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that  
Virus H-delta-gM-w  
Deposit Reference 02101663

has been accepted as a patent deposit, in accordance with  
The Budapest Treaty of 1977,  
with the European Collection of Cell Cultures on  
16 October 2002

  
.....  
Dr D H Lewis  
General Manager  
ECACC

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO

INTERNATIONAL FORM

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH  
CONTACT DR AXEL LISCHESKI  
BUILDING 4576-02-02  
BINGER STRASSE 173  
INGELHEIM  
D-55216  
GERMANY

NAME AND ADDRESS  
OF DEPOSITOR

## I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR:

H-delta-gM-w

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:

02101663

## II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

- ☒ A scientific description  
☐ A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

## III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,  
which was received by it on 16 October 2002 (date of the original deposit)<sup>1</sup>

## IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International  
Depository Authority on (date of the original deposit) and  
A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty  
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

## IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Dr D H Lewis

Address: ECACC  
CAMR  
Porton Down  
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power  
to represent the International Depository  
Authority or of authorized official(s):

Date: 26/1/03

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

## INTERNATIONAL FORM

TO

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH  
CONTACT DR AXEL LISCHESKI  
BUILDING 4576-02-02  
BINGER STRASSE 173  
INGELHEIM  
D-55216  
GERMANY

## VIABILITY STATEMENT

Issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY  
identified on the following page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY  
TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT  
IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
<p>Name: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH CONTACT DR AXEL LISCHESKI BUILDING 4576-02-02 Address: BINGER STRASSE 173 INGELHEIM D-55216 GERMANY</p>	<p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:  02101663  Date of the deposit or of the transfer:  16 October 2002</p>
II. VIABILITY STATEMENT	
<p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 16 October 2002<sup>2</sup>. On that date, the said microorganism was</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable</p> <p><input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable</p>	

- 1 Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- 2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- 3 Mark with a cross the applicable box.

Form BP/4 (first page)

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED <sup>4</sup>	
ACCESSION NUMBER 02101663 - H-delta-gM-w WAS PLATED OUT ONTO RK13 CELLS. FULL CYTOPATHIC EFFECT I.E ROUNDED CELLS, HOLES IN MONOLAYER AND MANY DEAD CELLS WERE OBSERVED ON DAY TWO AFTER INOCULATION. THE DEPOSIT IS THEREFORE INFECTIOUS AND VIABLE.	
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Dr D H Lewis Address: ECACC CAMR Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 28/1/03

4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)



# Centre for Applied Microbiology and Research and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that  
CELL LINE VERO GM  
Deposit Reference 03012801

has been accepted as a patent deposit, in accordance with  
The Budapest Treaty of 1977,  
with the European Collection of Cell Cultures on  
28 January 2003

.....  
Dr D H Lewis  
General Manager  
ECACC

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO

INTERNATIONAL FORM

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH  
CONTACT DR AXEL LISCHESKI  
BUILDING 4576-02-02  
BINGER STRASSE 173  
INGELHEIM  
D-55216  
GERMANY

NAME AND ADDRESS  
OF DEPOSITOR

## I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR:

VERO GM

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY:

03012801

## II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒

A scientific description

☐

A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

## III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,  
which was received by it on 28 January 2003 (date of the original deposit)<sup>1</sup>

## IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International  
Depository Authority on (date of the original deposit) and  
A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty  
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

## IV. INTERNATIONAL DEPOSITORY AUTHORITY

Name: Dr D H Lewis

Address: ECACC  
CAMR  
Porton Down  
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power  
to represent the International Depository  
Authority or of authorized officials(s):

Date: 21/2/03

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired



BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

## INTERNATIONAL FORM

TO

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH  
CONTACT DR AXEL LISCHESKI  
BUILDING 4576-02-02  
BINGER STRASSE 173  
INGELHEIM  
D-55216  
GERMANY

## VIABILITY STATEMENT

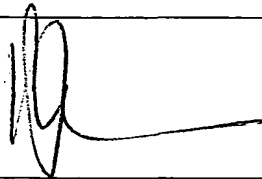
Issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY  
TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT  
IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
<p>Name: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH CONTACT DR AXEL LISCHESKI BUILDING 4576-02-02</p> <p>Address: BINGER STRASSE 173 INGELHEIM D-55216 GERMANY</p>	<p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  03012801</p> <p>Date of the deposit or of the transfer:  28 January 2003</p>
<p>II. VIABILITY STATEMENT</p> <p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 28 January 2003</p> <p> <input checked="checked" type="checkbox"/> <sup>3</sup>      viable         </p> <p> <input type="checkbox"/> <sup>3</sup>      no longer viable         </p>	

- 1      Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
- 2      In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
- 3      Mark with a cross the applicable box.

Form BP/4 (first page)

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED <sup>4</sup>	
THE PATENT DEPOSIT VERO GM - 03012801 WAS COUNTED AND TESTED FOR VIABILITY USING THE TRYPAN BLUE DYE EXCLUSION METHOD. THE CELLS ARE VIABLE AND HAVE PASSED THE SPECIFIC CRITERIA FOR VIABLE CELLS.	
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Dr D H Lewis Address: ECACC CAMR Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG	 Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 21/8/03

<sup>4</sup> Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)

17



# Centre for Applied Microbiology and Research and European Collection of Cell Cultures

This document certifies that  
Virus                      EHV-4  
Deposit Reference 03011401

has been accepted as a patent deposit, in accordance with  
The Budapest Treaty of 1977,  
with the European Collection of Cell Cultures on  
14 January 2003

.....  
Dr D H Lewis  
General Manager  
ECACC

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

TO

INTERNATIONAL FORM

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH  
CONTACT DR AXEL LISCHESKI  
BUILDING 4576-02-02  
BINGER STRASSE 173  
INGELHEIM  
D-55216  
GERMANY

NAME AND ADDRESS  
OF DEPOSITOR

## I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM

Identification reference given by the  
DEPOSITOR:

EHV-4

Accession number given by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:

03011401

## II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION

The microorganism identified under I above was accompanied by:

☒ A scientific description

☐ A proposed taxonomic designation

(Mark with a cross where applicable)

## III. RECEIPT AND ACCEPTANCE

This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above,  
which was received by it on 14 January 2003 (date of the original deposit)<sup>1</sup>

## IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION

The microorganism identified under I above was received by this International  
Depository Authority on (date of the original deposit) and  
A request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty  
was received by it on (date of receipt of request for conversion)

## IV. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: Dr D H Lewis

Address: ECACC  
CAMR  
Porton Down  
Salisbury SP4 0JG

Signature(s) of person(s) having the power  
to represent the International Depository  
Authority or of authorized official(s):

Date: 6/3/03

<sup>1</sup> Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL  
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS  
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO

BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH  
CONTACT DR AXEL LISCHESKI  
BUILDING 4576-02-02  
BINGER STRASSE 173  
INGELHEIM  
D-55216  
GERMANY

## VIABILITY STATEMENT

Issued pursuant to Rule 10.2 by the  
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY  
identified on the following page

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY  
TO WHOM THE VIABILITY OF STATEMENT  
IS ISSUED

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
<p>Name: BOEHRINGER INGELHEIM VETMEDICA GmbH CONTACT DR AXEL LISCHESKI BUILDING 4576-02-02</p> <p>Address: BINGER STRASSE 173 INGELHEIM D-55216 GERMANY</p>	<p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:  03011401</p> <p>Date of the deposit or of the transfer:  14 January 2003</p>
II. VIABILITY STATEMENT	
<p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 14 January 2003<sup>1</sup>. On that date, the said microorganism was</p> <p><input checked="checked" type="checkbox"/> <sup>3</sup> viable</p> <p><input type="checkbox"/> <sup>3</sup> no longer viable</p>	

- 1 Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).
  - 2 In the cases referred to in Rule 10.2 (a) (ii) and (iii), refer to the most recent viability test.
  - 3 Mark with a cross the applicable box.
- Form BP/4 (first page)

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED	
THE PATENT DEPOSIT EHV-4 - 03011401, PASSED ITS VIABILITY TEST BY THE APPEARANCE OF CYTOPATHIC EFFECT IN VERO-GM CELLS AFTER 6 DAY.	
II. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Dr D H Lewis Address: ECACC CAMR Porton Down Salisbury Wiltshire SP4 0JG	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): Date: 6/3/03

4 Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Form BP/9 (second and last page)